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

Daniel José Matos de Medeiros Lima

# Efeito das estatinas sobre a progressão da cardiomiopatia induzida por doxorrubicina

Rio de Janeiro
2018

Daniel José Matos de Medeiros Lima

# Efeito das estatinas sobre a progressão da cardiomiopatia induzida por doxorrubicina

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Jorge José de Carvalho

Coorientadora: Prof.ª Dra. Cristiane Matsuura

Rio de Janeiro

2018

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

L732 Lima, Daniel José Matos de Medeiros.
Efeito das estatinas sobre a progressão da cardiomiopatia induzida por doxorrubicina / Daniel José Matos de Medeiros Lima. – 2018.
78 f.

Orientadora: Jorge José de Carvalho.
Coorientador: Cristiane Matsuura.
Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Doxorrubicina - Toxicidade - Teses. 2. Cardiotoxicidade – Teses. 3. Rosuvastatina cálcica – Uso terapêutico - Teses. 4. Estatinas (Agentes cardiovasculares) – Efeitos colaterais - Teses. 5. Cardiomiopatias – Tratamento farmacológico – Teses. 6. Estresse oxidativo – Teses. 7. Ratos como animais de laboratório – Teses. I. Carvalho, Jorge José de. II. Matsuura, Cristiane. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.12:612.014.46

Bibliotecária: Kalina Silva CRB7/4377

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

_____ _____

Assinatura Data

Daniel José Matos de Medeiros Lima

**Efeito das estatinas sobre a progressão da cardiomiopatia induzida por doxorrubicina**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 19 de março de 2018.

Coorientadora: Prof.ª Dra. Cristiane Matsuura
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

_____
Prof. Dr. Jorge José de Carvalho (Orientador)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____
Prof.ª Dra. Fabiane Ferreira Martins
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____
Prof. Dr. Mario Fritsch Toros Neves
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

_____
Prof. Dr. Miguel de Lemos Neto
Faculdade de Medicina de Campos

_____
Prof. Dr. Vinícius Novaes Rocha
Universidade Federal de Juiz de Fora

Rio de Janeiro

2018

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho em especial aos meus pais, André e Ana Cláudia por sempre confiarem em minhas escolhas e decisões, as minhas queridas irmãs e a meus amigos que sempre me apoiaram nessa árdua trajetória.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, André Luís e Ana Cláudia, a quem devo minha existência, meus valores e princípios, meus heróis dos quais admiro muito, as minhas irmãs Laís e Mayara, por mesmo longe estarem sempre presentes na minha vida.

Aos orientadores Prof.ª Dra. Cristiane Matsuura e Prof. Dr. Jorge José de Carvalho, por sempre estarem presentes, depositando sua confiança e acreditando em meu potencial. Obrigado por toda atenção e dedicação empenhada.

Ao Prof. Dr. Antônio Cláudio Mendes Ribeiro (em memória), por ter abertos as portas para mim quando ninguém mais o fez, acreditou e depositou sua confiança e dedicação. Obrigado querido professor.

À Prof.ª Dra. Tatiana Marlowe Cunha Brunini, que mesmo longe sempre se preocupou com seus (ex)alunos, o meu obrigado pelo carinho e dedicação nos momentos mais difíceis.

Aos Amigos queridos que sempre estiveram presentes não só nos momentos bons mas nos momentos de dificuldades enfrentados durante essa jornada. Wanda Vianna, sempre sorridente, alto astral, prestativa e paciente comigo, da qual me emprestou seus ouvidos e me ajudou muito durante muitos experimentos, OBRIGADO, sem você esse trabalho seria muito mais difícil.

À amiga Marcela Anjos, da qual admiro muito, apesar do pingo de gente é uma grande mulher com um grande coração, forte, humilde, caridosa e companheira, obrigado por toda ajuda que me dera.

À amiga Iara Karise, pelos conselhos, pelas broncas e pelos ouvidos sempre disposta a ajudar.

À amiga e segunda mãe Marcia Ferraz, pela paciência que tivestes desde o início quando cheguei ao laboratório, onde tudo era novidade e sempre foi prestativa e atenciosa. Obrigado por sempre me ouvir e me ajudar nos momentos difíceis.

Aos amigos que fazem ou já fizeram parte do Laboratório de Transporte de Membrana: Monique Oliveira, Daniele Abrantes, entre outros que passaram por nós. Vocês são o motivo de tornaram o meus dias mais felizes, mais prazerosos, eu simplesmente amo trabalhar com vocês!

Aos amigos companheiros do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e Plantas Medicinais: Graziele de Bem, Cristiane da Costa, Lenize e Prof.ª Angela. Sempre prestativos e pacientes, meu muito obrigado por toda ajuda de vocês!

Agradecimento à agência de fomento FAPERJ por tornar o projeto de pesquisa uma realidade

E a todos que participaram de forma direta ou indireta desta caminhada, nessa fase da qual adquiri muita experiência profissional e pessoal.

Força, foco e fé.

E aqueles que foram vistos dançando, foram julgados insanos por aqueles que não podiam escutar a música.

*Friedrich Nietzsche*

# RESUMO

LIMA, Daniel José Matos de Medeiros. *Efeito das estatinas sobre a progressão da cardiomiopatia induzida por doxorrubicina.* 2018. 78 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

A cardiotoxicidade induzida por antraciclinas já vem sido documentada há décadas e ainda os mecanismos que levam a esse efeito colateral limitante são incertos. Algumas evidências apontam para um aumento do estresse oxidativo (EO) e ativação de vias apoptóticas, mas como ocorre a progressão dessa condição também pouco se sabe. Além disso, muitas estratégias terapêuticas têm sido estudadas a fim de minimizar ou evitar a toxicidade cardíaca, e uma delas são as estatinas. Nosso estudo teve como objetivo entender a progressão da cardiomiopatia induzida por doxorrubicina (DOX) e testar a rosuvastatina (ROS), uma potente estatina, como terapia adjuvante para minimizar os efeitos cardiotóxicos. Utilizamos 96 ratos sprague-dawley divididos em dois estudos; o primeiro estudo sobre a progressão da cardiomiopatia onde utilizamos uma dose de 1 mg/kg/dia de DOX durante 10 dias e os animais foram divididos em 4 grupos: controle, DOX1, DOX2 e DOX4 (sacrificados 1, 2 e 4 semana após o termino da infusão de doxorrubicina respectivamente). No segundo estudo utilizando a rosuvastatina, onde os animais foram divididos em 4 grupos: Controle, DOX (idem DOX4), ROS (receberam 20 mg/kg/dia durante e após a administração de DOX) e DOX-ROS. Foram realizados experimentos para analisas a função cardíaca (Langendorff), função vascular (banho de órgãos), analise das enzimas antioxidantes, marcadores de estresse oxidativo, microscopia ótica (MO) e eletrônica (ME). Observamos primeiramente alterações ultra estruturais como desorganização dos cardiomiócitos, alterações nucleares, vacuolização citoplasmática e mitocondrial com piora progressiva (observados na microscopia eletrônica), como também uma redução a resposta catecolaminérgica (reatividade vascular) e posteriormente ativação de vias apoptóticas (TUNEL) e perda de função (Langendorff). Ao incluirmos a rosuvastatina em um esquema terapêutico, nossos resultados demonstraram uma redução do estresse oxidativo (marcadores de EO – TBARS e gupos carbonila), deposição de fibras de colágeno no interstício cardíaco (MO), preservação da microcirculação cardíaca (imunohistoquímica) e da resposta a vasodilatadores dependentes do endotélio no leito arterial mesentérico (reatividade vascular). Com esses resultados podemos concluir que a cardiomiopatia induzida por doxorrubicina se dá de forma continua e progressiva, onde primariamente parecem ocorrer alterações morfológicas onde posteriormente modificações funcionais se tornam evidentes. O esquema terapêutico com ROS parece ser promissor, uma vez que preservou a função e estrutura vascular como também reduziu o quadro de estresse oxidativo, podendo possivelmente conferir uma cardioproteção em um regime quimioterápico.

Palavras-chave: Doxorrubicina. Estatinas. Cardiotoxicidade. Cardiomiopatia. Rosuvastatina.

## ABSTRACT

LIMA, Daniel José Matos de Medeiros. *Effect of statins on the progression of cardiomyopathy induced by doxorubicin.* 2018. 78 f. Dissertação (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

The cardiotoxicity anthracycline-induced has been documented for decades, and the mechanisms that lead to this limiting side effect are uncertain. Some evidence points to increase in oxidative stress and activation of apoptotic pathways, but as the progression of this condition occurs, is unknown. In addition, many therapeutic strategies have been studied in order to minimize and/or avoid cardiotoxicity, and one of them is statins. Our study aimed to understand the progression of cardiomyopathy doxorubicin-induced (DOX) and to test rosuvastatin (ROS), a potent statin, as adjunctive therapy to minimize cardiotoxic effects. We used 96 sprague-dawley rats divided into two studies; one on the progression of cardiomyopathy where we used a dose of 1 mg / kg / day DOX for 10 days and the animals were divided into 4 control groups: DOX1, DOX2 and DOX4 (sacrificed at 1, 2 and 4 weeks after the termination of infusion of doxorubicin respectively). In the other study using rosuvastatin, the animals were divided into 4 groups: Control, DOX (idem DOX4), ROS (received 20 mg / kg / day during and after administration of DOX) and DOX-ROS. Experiments were performed to analyze cardiac function (Langendorff), vascular function (organ bath), and analysis of antioxidant enzymes, oxidative stress markers, optical and electronic microscopy. We first found ultrastructural alterations such as cardiomyocyte disorganization, nuclear alterations, cytoplasmic and mitochondrial vacuolization with progressive worsening, as well as a reduction in catecholaminergic response and later activation of apoptotic pathways and loss of function. When we included rosuvastatin in a therapeutic regimen, our results demonstrated a reduction of oxidative stress, deposition of collagen fibers in the cardiac interstice, preservation of cardiac microcirculation and response to endothelium-dependent vasodilators in the mesenteric arterial bed. With these results, we can conclude that doxorubicin-induced cardiomyopathy occurs continuously and progressively, where morphological alterations appear to occur primarily where functional modifications later become evident. The therapeutic regimen with ROS seems to be promising, since it has preserved vascular function and structure as well as reduced oxidative stress, possibly imparting cardioprotection in a chemotherapeutic regimen.


Keywords: Doxorubicin. Cardiotoxicity. Rosuvastatin. Statin. Cardiomyopathy.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES


Quadro 1 - Diretrizes para o monitoramento da FEVE durante a terapia com DOX (1, 18, 26)..... 18

Quadro 2 - Abordagens farmacológicas para prevenção da cardiotoxicidade induzida por quimioterapia por antraciclinas..... 22

Figura 1 - Esquema do delineamento experimental do estudo A..... 31

Figura 2 - Esquema do delineamento experimental do estudo B..... 38

Quadro 3 - Valores referentes a massa corporal (MC), ventrículo esquerdo (VE) e coração total (CT) dos grupos experimentais do estudo A..... 40

Figura 3 - Efeitos da doxorrubicina sobre os parâmetros hemodinâmicos basais (esquerda) e a resposta cardíaca sob o estímulo adrenérgico com norepinefrina (direita)..... 41

Figura 4 - Efeito da administração de doxorrubicina sobre a atividade das enzimas antioxidantes endógenas e marcadores de estresse oxidativo no tecido cardíaco e no plasma..... 43

Figura 5 - Micrografia de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo de animais controle e tratados com doxorrubicina, obtidas em microscópio eletrônico de transmissão..... 45

Figura 6 - Efeito da administração de doxorrubicina sobre a marcação de fibras colágeno sob luz polarizada no tecido cardíaco (Técnica de coloração de Picro Sirius Red)..... 47

Figura 7 - Efeito da administração de doxorrubicina sobre a marcação de núcleos apoptóticos no tecido cardíaca (Técnica de imunofluorescênciaTUNEL)..... 48

Gráfico 1 – Efeito da administração de doxorrubicina sobre a resposta vasodilatadora da acetilcolina (Ach) no LAM de animais..... 49

Gráfico 2 – Efeito da administração de doxorrubicina sobre a resposta vasodilatadora da nitroglicerina no LAM de animais. Valores expressos em média ± EP, n=8 por grupo……..... 50

Tabela 1 - Valores referentes a massa corporal (MC), ventrículo esquerdo (VE) e coração total (CT) dos grupos experimentais do estudo B..... 51
Figura 8 - Efeito do tratamento com rosuvastatina sobre a atividade das enzimas antioxidantes endógenas e marcadores de estresse oxidativo no tecido cardíaco de animais com cardiomiopatia induzida por doxorrubicina..... 52
Figura 9 - Fotomicrografias de tecido miocárdico coradas com hematoxilina e eosina (H&E) sob o aumento de 40x..... 53
Figura 10 - Efeito do tratamento com rosuvastatina sobre a marcação de fibras colágeno sob luz polarizada em animais com cardiomiopatia induzida por doxorrubicina. Técnica de coloração de Picro Sirius Red..... 54
Figura 11 - Efeito do tratamento com rosuvastatina sobre a marcação de α-actina de músculo liso na microcirculação cardíaca em animais com cardiomiopatia induzida por doxorrubicina..... 55
Gráfico 3 – Efeito do tratamento adjuvante com Rosuvastatina sobre a resposta vasodilatadora da acetilcolina (Ach) no LAM de animais com cardiomiopatia induzida por doxorrubicina..... 56
Gráfico 4 – Efeito do tratamento adjuvante com Rosuvastatina sobre a resposta vasodilatadora da nitroglicerina no LAM de animais com cardiomiopatia induzida por doxorrubicina..... 57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---|---|
| AGP | Ácidos graxos poli-insaturados |
| BNP | *brain-type natriuretic peptide* |
| CAT | Catalase |
| DOX | Doxorrubicina |
| DCV | Doença cardivascular |
| DMAPP | Pirofosfato de dimetilalilo |
| eNOS | Óxido nítrico sintase endotelial |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| EPM | Erro padrão da média |
| ERNs | Espécies reativas de nitrogênio |
| EROs | Espécies reativas de oxigênio |
| FEVE | Fração de ejeção do ventrículo esquerdo |
| FPP | Farnesilpirofosfato isoprenóide |
| GCs | Guanilato ciclase solúvel |
| GGPP | Geranil-geranil-pirofosfato |
| GMPc | Guanosina monofosfato cíclica |
| GPx | Glutationa Peroxidase |
| GTP | Guanosina trifosfato |
| ICC | Insuficiência cardíaca congestíva |
| IPP | Pirofosfato de isopentenilo |
| MDA | Malondialdeído |
| NO | Óxido nítrico |
| NOS | Óxido nítrico sintase |
| $OH^-$ | Radical hidroxila |
| $ONOO^-$ | Peroxinitrito |
| PCR | Proteína C reativa |
| ROS | Rosuvastatina |
| SOD | Superóxido dismutase |
| SRAA | Sistema renina-angiotensina-aldosterona |
| TBARS | Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico |
| VE | Ventrículo esquerdo |

**SUMÁRIO**


| | | |
|---|---|---|
| | **INTRODUÇÃO**..... | 14 |
| 1 | **REVISÃO DA LITERATURA**..... | 15 |
| 1.1 | **Toxicidade induzida pelas antraciclinas**..... | 15 |
| 1.2 | **Diagnóstico da cardiotoxicidade induzida por antraciclinas**..... | 16 |
| 1.3 | **Prevenção da cardiotoxicidade**..... | 20 |
| 1.4 | **Efeitos Pleiotrópicos das Estatinas**..... | 24 |
| 2 | **OBJETIVOS**..... | 29 |
| 2.1 | **Objetivos gerais**..... | 29 |
| 2.2 | **Objetivos específicos**..... | 29 |
| 3 | **MATERIAL E MÉTODOS**..... | 30 |
| 3.1 | **Estudo A – Progressão da cardiomiopatia induzida pela doxorrubicina**..... | 30 |
| 3.1.1 | Delineamento experimental..... | 30 |
| 3.1.2 | Função ventricular esquerda em coração isolado..... | 31 |
| 3.1.3 | Microscopia de Luz..... | 32 |
| 3.1.4 | Microscopia Eletrônica de Transmissão..... | 32 |
| 3.1.5 | Imunifluorescência – TUNEL..... | 33 |
| 3.1.6 | Isolamento do leito arterial mesentérico (LAM)..... | 33 |
| 3.1.7 | Mensuração da Reatividade do LAM às substancias vasoativas..... | 34 |
| 3.1.8 | Biomarcadores de estresse oxidativo..... | 35 |
| 3.1.8.1 | Determinação da peroxidação lipídica..... | 35 |
| 3.1.8.2 | Determinação da carbonilação de proteínas..... | 35 |
| 3.1.9 | Atividade das enzimas antioxidantes..... | 36 |
| 3.1.9.1 | Atividade da enzima superóxido dismutase..... | 36 |
| 3.1.9.2 | Atividade da enzima catalase (CAT)..... | 36 |
| 3.1.9.3 | Atividade da enzima glutationa peroxidase (GPx)..... | 37 |
| 3.2 | **Estudo B – Tratamento adjuvante com Rosuvastatina**..... | 37 |
| 3.2.1 | Delineamento experimental..... | 37 |
| 3.2.2 | Experimentos..... | 38 |
| 3.2.3 | Imunohistoquímica..... | 38 |

3.3 **Análise estatística**..... 39
4 **RESULTADOS**…….. 40
4.1 **Estudo A – Progressão da cardiomiopatia induzida por doxorrubicina**..... 40
4.1.1 Massa corporal…….. 40
4.1.2 Efeito da administração de doxorrubicina sobre a função cardíaca..... 40
4.1.3 Efeito da administração de doxorrubicina sobre os parâmetros de estresse oxidativo no tecido cardíaco ..... 42
4.1.4 Efeito da administração de doxorrubicina sobre a ultraestrutura dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo..... 44
4.1.5 Efeito da administração de doxorrubicina sobre a deposição de fibras colágeno no tecido cardíaco e indução da apoptose..... 46
4.1.6 Efeito da administração de doxorrubicina sobre a resposta vasodilatadora induzida por acetilcolina e nitroglicerina no leito arterial mesentérico (LAM)..... 49
4.2 **Estudo B – Tratamento Adjuvante com Rosuvastatina**..... 50
4.2.1 Massa Corporal, massa do ventrículo esquerdo e do coração..... 50
4.2.2 Efeito da intervenção com rosuvastatina sobre os parâmetros de estresse oxidativo em animais que receberam doxorrubicina em tecido cardíaco..... 51
4.2.3 Papel protetor da Rosuvastatina sobre a morfologia do tecido cardíaco 53
4.2.4 Efeito do tratamento adjuvante com rosuvastatina sobre a resposta vasodilatadora induzida por acetilcolina e nitroglicerina em animais com cardiomiopatia induzida por doxorrubicina..... 56
5 **DISCUSSÃO**..... 58
**CONCLUSÃO**..... 65
**REFERÊNCIAS**..... 66

## INTRODUÇÃO

As antraciclinas são antibióticos extraídos de uma bactéria filamentosa denominada *straptomyces peucetius*, são altamente eficazes e possuem um amplo espectro como agentes anticâncer. A cardiotoxicidade consiste em um grande fator limitante para sua utilização clínica (1-5). Tais agentes contém um anel antraquinona, que resulta na formação de peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$) e espécies reativas de oxigênio como ânion superóxido ($O_2.^-$) através do ciclo redox (6).

As antraciclinas como a Doxorrubicina (DOX), um dos antibióticos antracíclicos mais utilizados na clínica oncológica para o tratamento de diversos tipos de canceres como linfomas, leucemias, sarcomas e câncer de mama; tem como mecanismo de ação antitumoral inibir a síntese de DNA e RNA se intercalando entre os pares de base e também pela inibição da atividade da topoisomerase II, o que acaba por impedir a reparação do DNA (7). Um dano oxidativo provocado pelos radicais livres, peroxidação das membranas lipídicas celulares, alterações dos níveis de $Ca^{2+}$ pelo retículosarcoplasmático assim como na síntese de proteínas, contribuem para uma condição de cardiotoxicidade induzida pelas antraciclinas (3, 7), o que acaba por ser um fator limitante de sua utilização clínica.

Muitos estudos têm sido realizados para tentar traçar estratégias que minimizem ou até mesmo inibam o surgimento da cardiotoxicidade e um fármaco em potencial que possui efeitos pleiotrópicos tem chamado atenção, que são as estatinas. A rosuvastatina é a estatina mais potente de sua família e um estudo de coorte retrospectivo, observacional demonstrou que mulheres com diagnóstico de câncer de mama, que já faziam o uso de estatinas, tinham um risco reduzido de desenvolver IC (insuficiência cardíaca) quando comparado as que não faziam uso (8).

Os mecanismos responsáveis por essa cardioproteção induzida pelas estatinas ainda é área recente de investigação. Buscar o entendimento da progressão da cardiomiopatia induzida por doxorrubicina e propor o uso de estatinas como possível agente adjuvante cardioprotetor levou a divisão do nosso estudo em duas partes.

# 1 REVISÃO DA LITERATURA

## 1.1 Toxicidade induzida pelas antraciclinas

As alterações morfológicas e funcionais que são observadas em paciente sob o esquema terapêutico com DOX descritas na literatura e na pesquisa básica, resultam de uma lesão progressiva e cumulativa dos cardiomiócitos, com ativação das vias de necrose e apoptose, dilatações do ventrículo esquerdo (VE), disfunção contrátil, cardiomiopatia hipertrófica e remodelamento cardíaco (9). A cardiopatia induzida pela DOX pode ser caracterizada como aguda e crônica. A cardiotoxicidade aguda pode ocorrer durante ou logo após o início do regime quimioterápico, geralmente ocorre de forma transitória e se limita a miopericardites, alterações de repolarização não específicas no ECG, arritmias, elevação de troponina e disfunção transitória do VE (10). Essas alterações observadas geralmente desaparecem de forma espontânea apenas com terapia de suporte. No entanto, a cardiotoxicidade crônica é a forma mais comum e importante da toxicidade induzida pelo quimioterápico, que é composta por disfunção sistólica de VE, que é insidiosa e assintomática nos estágios iniciais, podendo progredir para uma cardiomiopatia dilatada e cardiomiopatia hipertrófica, que geralmente é um quadro irreversível. A cardiotoxicidade crônica é categorizada como do tipo I, de início-precoce (onde geralmente é diagnosticada dentro de um ano após o término do regime quimioterápico) e do tipo II ou início-tardio (geralmente é diagnosticado após o primeiro ano ou até décadas após a conclusão da quimioterapia)(2, 11, 12). A maioria dos pacientes desenvolvem cardiotoxicidade crônica dentro do primeiro ano após o termino do regime quimioterápico (5).

Um regime quimioterápico mais intenso, onde pode haver a necessidade de maiores doses cumulativas de DOX, é um fator determinante para o aumento do risco de cardiotoxicidade (13). Outros fatores que podem aumentar o risco de cardiotoxicidade são: pacientes com idade superior a 65 anos ou inferior a 5 anos, hipertensão arterial sistêmica, pacientes do sexo feminino, doença cardíaca pré-existente, associação com radioterapia (irradiação mediastinal), quimioterapia com outros agentes cardiotóxicos como ciclofosfamida, doses cumulativas de DOX

(valores superiores a 450 mg/m$^2$) e um esquema terapêutico com administração em bolus *versus* infusão fracionado em um período de 48-72 h. Outro fator que pode aumentar o risco de cardiotoxicidade é a sobrecarga de ferro devido a várias transfusões sanguíneas, pacientes que fazem terapia de reposição de ferro e algumas mutações genéticas de manipulação do ferro, também podem compor uma maior suscetibilidade ao desenvolvimento de cardiotoxicidade (3, 10, 14, 15).

A disfunção ventricular esquerda assintomática e subclínica geralmente precedem as manifestações de uma insuficiência cardíaca (IC) (16-19). Uma interrupção da terapia com antraciclinas com o surgimento da disfunção ventricular esquerda assintomática pode impedir a progressão da ICC e é fundamental como estratégia na prevenção da ICC induzida por antraciclinas. Mas devemos ressaltar que deve-se levar em consideração o risco-benefício para o paciente, de descontinuidade da quimioterapia deve ser discutida juntamente com a equipe médica, uma decisão que cabe ao oncologista em colaboração com o cardiologista. A cardiotoxicidade crônica induzida por antraciclinas também pode aparecer como cardiomiopatia restritiva com disfunção diastólica e insuficiência cardíaca concomitante a irradiação mediastinal. Deve-se realizar o monitoramento da função do VE para observar o aparecimento precoce de qualquer alteração cardíaca. A incidência de IC associada ao uso de doxorrubicina foi entre 4 e 7% em pacientes que recebiam doses em torno de 400 a 550 mg/m$^2$, de 18% nos que recebiam doses de 551 a 700 mg/m$^2$ e de 30% nas doses superiores a 700 mg/m$^2$ (18-20).

## 1.2 **Diagnóstico da cardiotoxicidade induzida por antraciclinas**

Existe uma grande variação na susceptibilidade dos pacientes à cardiotoxicidade induzida por um regime quimioterápico com antraciclinas que está provavelmente ligada provavelmente a genes relacionados ao metabolismo da antraciclinas (21), na depuração de radicais livres ou na composição corporal de íons de ferro (14, 15). Contudo, os mecanismos celulares, moleculares, bioquímicos e genéticos relacionados com a variação da susceptibilidade à cardiotoxicidade, ainda não são completamente compreendidos. Outros agentes quimioterápicos como Trastuzumabe, Sunitinibe, Sorafenibe e Inibidores da Tirosina kinase podem produzir

uma cardiotoxicidade não relacionada com doses cumulativas, podendo ser reversíveis ou potencializar o efeito cardiotóxicos das antraciclinas (22-25).

Como existe essa variação individual na susceptibilidade de alguns pacientes a cardiotoxicidade induzida por antraciclinas, não seria prudente determinar um teto de forma arbitrária para dose com o intuito de prevenir o desenvolvimento de ICC, onde dessa forma poderia acabar prejudicando aqueles que poderiam se beneficiar de um regime mais agressivo, por tolerar melhor altas doses sem desenvolver cardiotoxicidade. Portanto, uma abordagem de monitoramento da função ventricular esquerda durante o esquema terapêutico com antraciclinas e a descontinuidade do tratamento com o aparecimento de disfunção ventricular subclínica (dependendo da decisão da cardio-oncologia), permanece com uma estratégia eficaz na prevenção da IC(23, 25).

Existem algumas considerações importantes a respeito da monitorização da função do VE com o intuito de prevenir a cardiotoxicidade. A fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) é uma variável amplamente estudada e a variável mais bem estabelecido na prevenção de IC. Uma vez que essa abordagem baseia-se na detecção de pequenas alterações subclínicas, mas a queda da FEVE como evidência sugere a interrupção do regime quimioterápico com antraciclina, pode ser um pouco equivocado já que a confiabilidade, reprodutibilidade, precisão, variabilidade e custo são fatores importantes na escolha de uma técnica para a monitorização da FEVE. Existem técnicas disponíveis para a monitorização da FEVE e são frequentemente utilizadas na prática clínica. Contudo, as técnicas com maior variabilidade de medida são menos eficazes e menos onerosas, ao passo que as técnicas com maior precisão e reprodutibilidade entre os avaliadores, são mais adequadas e onerosas (1, 16).

A angiocardiografia por radionuclídeos (ERNA), ventriculografia por radionuclídeos (RNV) ou a ressonância magnética cardíaca, atendem a esses requisitos de reprodutibilidade e variabilidade. Destas técnicas de imagem, a ERNA ou MUGA *(multigated acquisition)*, tem sido uma das técnicas mais estudadas e utilizadas nos últimos 30 anos. Os pesquisadores Schwartz, Alexander, Zaret et al. foram os pioneiros em estabelecer parâmetros na previsão da ICC induzida por DOX, utilizando a monitorização da FEVE por ERNA (1, 16, 17, 19). As recomendações para avaliação e monitoramento da FEVE foram desenvolvidas com bases nos estudos citados anteriormente e estes parâmetros estão descritos no Quadro1.

Quadro 1- Diretrizes para o monitoramento da FEVE durante a terapia com DOX (1, 18, 26)

| Valores de FEVE basal | Avaliação da FEVE | Critérios de descontinuidade para prevenir a ICC |
|---|---|---|
| Normal (≥ 50%) | Antes de iniciar a terapia<br>Entre 250-300 mg/m$^2$<br>*Entre 400-450 mg/m$^2$<br>Antes de cada dose subsequente. | Queda da FEVE ≥10% ou <50% |
| 30-50% | Antes de começar a terapia e antes de cada dose subsequente | Queda da FEVE ≥10% ou FEVE de <30% |
| <30% | Evitar terapia com DOX | |

Nota: *acima de 400 mg/m$^2$ com doença cardíaca conhecida, hipertensão, exposição a radioterapia, anormalidades no ECG, terapia com altas doses de ciclofosfamida, usar outra antraciclina e utilizar esse guideline após converter para as respectivas doses toxicas.
Fonte: O autor, 2018.

Antes do início da quimioterapia com DOX é recomendado previamente à realização de uma ventriculografia por radionucleotídeos para um estudo mais detalhada da função cardíaca do paciente. Após o início da quimioterapia, é importante a verificação da FEVE com doses cumulativas entre 200-300 mg/m$^2$ e 400-450 mg/m$^2$, após esses limites deve-se realizar a aferição antes de cada dose subsequente. Pode ser recomendada a suspensão da quimioterapia com DOX quando for observada uma redução na FEVE de ≥10% ou quando a FEVE atingem valores ≤50%. Em pacientes que apresentam uma FEVE inferior a 50%, é recomendado realizar a avaliação da FEVE antes de cada dose de DOX. É recomendada a interrupção da quimioterapia quando for observada uma redução de 10% ou quando o paciente alcança valores de FEVE inferiores a 30% (17, 19). A quimioterapia com DOX e seus análogos deve ser evitada casa o paciente apresente uma FEVE ≤30% e seguindo essas recomendações, Schwartz et al. demonstraram uma redução de até 7x na incidência de ICC (18). Um grande problema em relação à avaliação da FEVE por ecocardiografia bidimensional é que possui uma variabilidade em torno de 10% (27), o que acaba tornando difícil a detecção de pequenas variações da FEVE que são exigidas para o monitoramento da progressão da ICC (18, 28). Já a ecocardiografia 3D parece melhorar a reprodutibilidade da FEVE. É possível observar uma disfunção diastólica de VE, onde um período prolongado de relaxamento

isovolumétrico e redução na velocidade de fluxo de pico são evidências que precedem uma disfunção sistólica (29).

Recentemente tem-se dado certa ênfase para o estudo de biomarcadores específicos altamente sensíveis para dano e lesão no miocárdio, tais como troponina-T, troponina-I, mioglobina, BNP (*brain-type natriuretic peptide*) e pro-BNP. Estes biomarcadores têm sido extensivamente estudados e são utilizados rotineiramente no acompanhamento e diagnostico de doença arterial coronariana, infarto agudo do miocárdio e angina instável. Também estão sendo utilizados na avaliação de condição associadas a lesões no miocárdio, não relacionadas a doença arterial coronariana (30). A elevação da troponina de alta sensibilidade seguida por um regime quimioterápico com antraciclinas indica lesão miocárdica e é um fator preditivo de importante declínio da FEVE quando comparados aqueles que não apresentam elevação de troponina (31). No entanto, não foi encontrada uma correlação consistente entre a elevação dos níveis de troponina e a cardiotoxicidade com antraciclinas ou trastuzumab (32-34). Apesar disso, ensaios de troponina de alta sensibilidade talvez possa adicionar um valor de “incremento” para o risco de cardiotoxicidade e ICC há quimioterapia. Um aumento do pro-BNP foi relatado precocemente após administração de antraciclinas, no entanto a elevação do pro-BNP não é um dado que comprove a susceptibilidade a disfunção ventricular esquerda. O papel desses biomarcadores estão sob investigação em um estudo multicêntrico denominado PREDICT, financiado pela NIH[*].

[*] M.D. Anderson Cancer Center. Effectiveness of Using Biomarkers to Detect and Identify Cardiotoxicity and Describe Treatment (PREDICT) [Internet]. Bethesda, Maryland, MD: US National Library of Medicine, 2009 Dec 15 [cited Feb 2018]. Available from: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01032278.

## 1.3 **Prevenção da cardiotoxicidade**

Quando falamos de prevenção da cardiotoxicidade, temos que levar em conta a necessidade de uma avaliação minuciosa dos pacientes, considerando todos os fatores que os tornam susceptíveis aos efeitos tóxicos dos quimioterápicos.

Algumas abordagens para redução da cardiotoxicidade nos esquemas de quimioterapia com DOX possuem uma taxa de sucesso bem limitada. A primeira estratégia desenvolvida foi a infusão lenta e contínua de DOX por períodos que variam de 24 até 96 h ao invés de uma injeção única e contínua, e os estudos iniciais encontraram uma menor taxa de cardiotoxicidade (35). No entanto, os estudos subsequentes não demonstraram uma redução na cardiotoxicidade. Além disso, devido a limitações logísticas para realização do esquema terapêutico, esse tipo de abordagem não foi bem recebido na prática clínica. Foi desenvolvido um sistema de distribuição da droga utilizando uma preparação lipossomal incorporada juntamente com a DOX, onde o fármaco é liberado diretamente no tumor o que reduziria a cardiotoxicidade. No entanto, os estudos clínicos tem sido inconclusivos em relação à cardiotoxicidade e a preparação lipossomal (36). Foram analisados vários análogos da DOX na tentativa de encontrar algum com menor taxa de cardiotoxicidade, porém, todos os agentes antracíclicos possuem certo grau de cardiotoxicidade. Atualmente é recomendada a conversão de dose “isotóxica” dos vários agentes antracíclicos onde: a doxorrubicina possui o fator 1 (de comparação com os outros agentes), assim como a daunorrubicina; a epirrubicina fator 0,67; mitoxantrona fator 4,0 e a idarrubicina fator 5,0 (37). Talvez estudos futuros na área de genômica possam ajudar a identificar marcadores de predisposição individuais para cardiotoxicidade por antraciclinas, antes mesmo de iniciar o tratamento.

Os antibióticos antracíclicos utilizam o ferro ($Fe^{2+}$) como um cofator na geração de radicais livres de oxigênio como $O^{2-}$, $H_2O_2$, $ONOO^-$ entre outros, que acabam por contribuir para cardiotoxicidade. O dexrazoxano, é um derivado do EDTA, eficaz como quelante de ferro que reduz a formação de radicais livres de oxigênio quando administrado concomitantemente as antraciclinas. Em dois estudos clínicos randomizados realizados com pacientes que tinham o diagnóstico de câncer de mama avançado e foram tratados com doxorrubicina, ciclofosfamida e

fluorouracilo, (38) os pesquisadores avaliaram a incidência de cardiotoxicidade com administração concomitante de dexrazoxano ou placebo.

Os pacientes que receberam dexrazoxano tiveram uma diminuição significativa na incidência de eventos cardiovasculares (definidos como uma redução na queda da FEVE) comparado com o placebo. Além disso, também foi observado que o dexrazoxano possuía um efeito cardioprotetor mesmo quando administrado aos pacientes já haviam recebido em média 300 $mg/m^2$ de antraciclinas (39). No entanto, devido a algumas preocupações com relação a diminuição das taxas de resposta tumoral, aumento da incidência de mielossupressão e aumento de malignidades hematológicas, seu uso na rotina não é recomendado em pacientes que façam uso do esquema terapêutico com antraciclinas. Uma meta-análise recente não demonstrou diferença nas taxas de resposta tumoral ou na incidência de malignidades hematológicas secundárias entre pacientes que realizaram esquema quimioterápico com ou sem dexrazoxano (40). Apesar desse dado, a Sociedade Americana de Oncologia Clínica (*American Society for Clinical Oncology*) atualmente só recomenda o uso de dexrazoxano em pacientes que receberam doses ≥250 $mg/m^2$ de doxorrubicina (41).

O Quadro 2 a seguir é um compilado de várias drogas que possuem um potencial papel adjuvante na prevenção da cardiotoxicidade induzida por quimioterapia, mais especificamente por antraciclinas.

Quadro 2 – Abordagens farmacológicas para prevenção da cardiotoxicidade induzida por quimioterapia por antraciclinas

| **Abordagem terapêutica** | Benefícios potenciais | Tipo de câncer e classe do quimioterápico estudado |
|---|---|---|
| **Dexrazoxano(38-41)** | Diminui o risco de eventos cardíacos, algumas evidências sugerem um aumento da taxa de malignidade secundária. | Administrado em pacientes com câncer de mama submetidos a quimioterapia com DOX e ciclofosfamida. |
| **Antagonistas da Aldosterona(42)** | Preserva a função diastólica e FEVE | Espironolactona administrado a pacientes com câncer de mama sob tratamento com antraciclinas. |
| **Bloqueadores do receptor de angiotensina (43)** | Diminuição da queda da FEVE comparado com grupo controle (placebo) | Candesartana administrada a pacientes com câncer de mama sob quimio com antraciclinas (com e sem Trastuzumab). |
| **Terapia combinada de β-bloq./IECA (44)** | **Diminuição da mortalidade, preservação da FEVE e menor taxa de ICC comparado com placebo** | **Carvedilol e Enalapril administrado a pacientes com leucemia** |
| **Estatinas (8, 45-47)** | FEVE preservada | Atorvastatina e Sinvastatina administrados para pacientes com câncer de mama, leucemias em quimio com antraciclinas e linfomas Hodgkin. |
| **β-bloqueadores(48)** | FEVE preservada quando comparado com IECA sozinho ou placebo. | Bisoprolol administrado em pacientes com diagnóstico precoce de câncer de mama (HER2+) |

Legenda: fração de ejeção do ventrículo esquerdo (EVE); DOX, doxorrubicina; IECA, Inibidor da enzima conversora de angiotensina.

Fonte: O autor, 2018.

Os antagonistas da aldosterona, que bloqueiam o final da via renina-angiotensina-aldosterona (RAA), possuem uma grande utilidade no tratamento da insuficiência cardíaca sistólica sintomática, mostrando-se também promissores agentes cardioprotetores. Um ensaio clínico randomizado com 83 mulheres diagnosticadas com câncer de mama, foram dividias em grupos onde um recebeu espironolactona (25 mg/dia) e o outro não (placebo), o esquema terapêutico se iniciava 1 semana antes e terminava 3 semanas após a quimioterapia com antraciclinas. Comparando com os pacientes do grupo placebo, o grupo tratado com espironolactona não apresentou declínio significativo da FEVE ou parâmetros da função diastólica após quimioterapia com antraciclinas (Quadro 2) (42).

O *trial* PRADA (*Prevention of Cardiac During Adjuvant Breast Cancer Therapy*), foi um estudo fatorial, randomizado, duplo-cego controlado por placebo, onde o demonstra a potencial utilidade dos antagonistas neuro-hormonais para prevenção da cardiotoxicidade induzida por quimioterápicos em pacientes com câncer de mama do tipo HER2+. O estudo utilizou candesartana e metoprolol como agentes potencialmente cardioprotetores contra esquemas quimioterápicos contra o câncer de mama, que utilizaram esquema combinado ou com de antraciclinas e/ou trastuzumab. No grupo que utilizou a candesartana, a taxa de diminuição da FEVE foi significativamente menor em comparação com o grupo placebo (-0,8 versus -2,6%, $p$ = 0,026). Contudo, quando se utilizou o metroprolol, não foi observada diferença significativa na taxa de declínio da FEVE quando comparado com o grupo placebo ($p$ = 0,77) (43).

Outro estudo interessante mencionado na Quadro 2 foi o *trial* OVERCOME (*Prevention of Left Ventricular Dysfunction with Enalapril and Carvedilol in Patients Submited to Intensive Chemotherapy for the Treatment of Malignant Hemopathies*) que testou os efeitos cardioprotetores da combinação de enalapril e carvedilol, administradas de forma concomitantemente com o regime de antraciclinas, em pacientes com diagnostico de leucemia aguda recém diagnosticada ou que foram submetidos a um transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas para doenças hematológicas malignas. O trial com enalapril e carvedilol demonstrou uma redução na taxa de declínio da FEVE quando comparado com placebo. Embora após seis meses tenha sido observado uma diferença estatística na FEVE verificada por ecocardiografia (3,1%, $p$ = 0,035), não foi observada essa diferença quando avaliada por ressonância magnética cardíaca (3,4%, $p$ = 0,09). O tratamento também foi capaz de reduzir o desfecho combinado de morte e insuficiência cardíaca em comparação com o grupo placebo (6,7 vs 22%, $p$ = 0,036). No entanto, um ponto de questionamento desse estudo é que na maioria das diferenças observadas, o desfecho foi conduzido por morte, ao invés de ICC. Uma limitação importante do estudo também é que não foi cego, portanto, os resultados estão propensos a viés do avaliador (44).

Em estudos pré-clínicos utilizando uma droga conhecido pelos seus efeitos “pleiotrópicos”, o pré-tratamento com estatinas reduziu o estresse oxidativo, marcadores de citocinas pró-inflamatórias e apoptose mediada por caspase em camundongos tratados com antraciclinas (45). Acredita-se que as estatinas podem

promover um efeito cardioprotetor contra a toxicidade induzida por antraciclinas através dos efeitos não hipolipemiantes.

Em dois pequenos estudos prospectivos com humanos, que avaliaram o potencial cardioprotetor da terapia com estatina, observaram-se resultados promissores (Quadro 2). Em um estudo realizado por Acar, Z. *et all*, 40 paciente em regime quimioterápico com antraciclinas foram randomizados para receber altas doses de atorvastatina (40 mg/dia) ou placebo durante um período de 6 meses. Os pacientes que receberam estatinas não foram observados declínio na FEVE com o esquema quimioterápico de antraciclinas, enquanto o grupo placebo apresentou uma redução significativa na FEVE de 63 a 55% após a quimioterapia (46). Da mesma forma, outro estudo com 51 pacientes diagnosticados com câncer de mama, linfoma e leucemia, avaliou-se a FEVE antes e depois do esquema terapêutico com antraciclina em 14 pacientes tratados com estatina e 37 que não receberam estatinas. Novamente, nesse estudo também não se observou alteração na FEVE dos pacientes tratados com estatina, mas diminuiu de forma significativa de 57,5% para 52,4% no grupo sem estatina (47). Tais estudos, embora não conclusivos, são ensaios com um potencial promissor e *trials* maiores são importantes para que possam avaliar a eficácia das estatinas à medida que os agentes cardioprotetores estão sendo utilizados.

Em um estudo de coorte retrospectivo, observacional com 201 mulheres que receberam quimioterapia com antraciclinas contra o câncer de mama recém-diagnosticado, a terapia incipiente com estatina levou a um risco reduzido de IC, em comparação com os controles correspondentes (hazard ratio 0.3, IC 95%: 0.1-0.9, $p = 0.03$). No entanto, esse achado pode conter alguns vieses, pois uma parte considerável dos pacientes avaliados faziam uso de inibidor da ECA e β-bloqueador no grupo de estatinas quando comparado com os controles (38,8% vs 14,9%, $p < 0{,}001$ e 38,8% versus 17,2%, $p < 0{,}001$, respectivamente) (48).

## 1.4 **Efeitos Pleiotrópicos das Estatinas**

A maior parte dos ensaios clínicos teve como foco indivíduos dislipidêmicos ou pacientes com doença cardiovascular (DCV) com altos níveis de colesterol LDL. A

análise do *trial Long-Term Intervention with Pravastatin in Ichaemic Disease* (LIPID) revela um efeito benéfico do tratamento com estatina contra novos eventos isquêmicos coronarianos em pacientes com DCV ou que necessitam de revascularização, independentemente dos níveis de LDL (49). Da mesma forma, uma análise *pos-hoc* do ensaio *Pleiotropic effect of lovastatin, with and without cholestyramine, in the post coronary artery bypass graft* (POST-CABG) revelou um efeito benéfico de um intensivo tratamento com estatina na doença aterosclerótica no enxerto de veia safena independentemente de uma redução do perfil lipídico (50). A ideia conceitual de que as estatinas poderiam ter efeitos além da sua redução de lipídios é ainda mais reforçada pelo grande *trial Justification for the Use of Statins in Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin* (JUPITER), no qual indivíduos normais, aparentemente saudáveis com altos níveis de proteína C reativa (PCR) foram randomizados em dois grupos, um fazendo uso de 20 mg/dia de rosuvastatina e o outro placebo (51). Os resultados do estudo demostram que rosuvastatina reduzia os níveis de PCR e a incidência de eventos cardiovasculares. Esses efeitos que são independentes da redução do perfil lipídico foram denominados "pleiotrópicos" e tem sido o foco de muitas pesquisas nos últimos 40 anos.

Os efeitos pleiotropicos das estatinas foram observados também sobre a função endotelial vascular em humanos, onde testaram diferentes estratégias hipolipemiantes. Em um estudo randomizado com pacientes portadores de ICC que foram tratados por 4 semanas com simvastatina ou ezetimiba (10 mg/dia), o grupo que fez uso de estatina apresentou uma dilatação mediado por fluxo (DMF) notavelmente melhor na artéria braquial quando comparados com o grupo que utilizou ezetimibe, apesar de observar uma redução similar dos níveis de LDL em ambos os grupos (52). De forma similar, outro estudo demonstrou que em pacientes dislipidêmicos sem DCV, o tratamento com 40 mg/dia de sinvastatina melhorou a DMF e reduziu a atividade Rho quinase vascular de forma significativamente maior do que 10 mg/dia de sinvastatina associado a 10 mg/dia de ezetimibe (53). Ainda outra meta-análise que examinou os efeitos do tratamento com estatina na DMF em pacientes diabéticos, concluiu que as estatinas são capazes de conferir uma melhora da função endotelial, mas apenas em pacientes que ainda não apresentaram uma disfunção endotelial importante (54).

Todos esses dados demonstram o importante papel da prevenção precoce e modificações dos fatores de risco, além dos benefícios adicionais do tratamento com

o uso de estatinas. No entanto, de forma curiosa, a descontinuidade do tratamento com sinvastatina em pacientes com DAC levou a uma redução importante da DMF após uma semana, tal efeito não foi correlacionado com o aumento dos níveis de LDL (53). Por outro lado, nos indivíduos saudáveis, onde houve uma interrupção abrupta do tratamento com estatina, também se observou uma redução da DMF logo após o primeiro dia, que acaba sendo restaurada aos níveis normais dentro de uma semana (53). Todas as evidências acerca das estatinas demonstram o potencial dos efeitos pleiotrópicos protetores do endotélio, quanto a necessidade da não descontinuidade do tratamento por parte do paciente.

Para entender melhor como se da parte dos efeitos pleiotrópicos das estatinas, é importante entender a base dos mecanismos de ação do qual ela reduz os níveis de colesterol endógeno.

As estatinas são moléculas orgânicas originalmente derivadas de fungos. O seu mecanismo de ação é a partir da inibição da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA), inibindo de forma competitiva a ligação do substrato ao sitio ativo da enzima, devido à sua semelhança estrutural com HMG-CoA (55). A HMG-CoA redutase é a enzima limitadora da síntese de mevalonato (Figura 2). Esta enzima converte HMG-CoA em mevalonato, que posteriormente é fosforilado e convertido em pirofosfato de isopentenilo (IPP) e pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP). Essas duas moléculas servem como precursores do farnesilpirofosfato isoprenóide (FPP), que é convertido em geranil-geranil-pirofosfato (GGPP) e esqualeno. Nas células hepáticas, o esqualeno é a base do ergosterol e em seguida a síntese de colesterol. Como já é sabido que grande parte do colesterol total presente do organismo humano é proveniente de síntese endógena, a inibição da HMG-CoA redutase pelas estatinas confere uma redução importante do colesterol e subsequentemente da biossíntese de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (56).

Os isoprenóides FPP e GGPP são produtos intermediários da via do mevalonato, que é inibida pelas estatinas. A prenilação das proteínas (ou seja, adição de unidades de isopreno) é uma importante modificação pós-tradução. A família das GTP-ases (Rac, Rho, Ras e etc.) é um importante alvo celular para prenilação. A adição de FPP ou GGPP em proteínas (farnesilação ou geranilgeranilação) é uma etapa crítica para a ancoragem das estruturas lipídicas e ativação da Rho e Rac (57). Após a geranilgeranilação de Rho ativa à proteína quinase (ROCK), a via Rho/ROCK está relacionada a uma gama de funções celulares, incluindo proliferação, migração

celular, sinalização redox e apoptose (58). Além disso, a Rac está envolvida na ativação do complexo NADPH oxidase, que desempenha um papel importante na produção de ROS (espécies reativas de oxigênio). A via do mevalonato não está ativa apenas nos hepatócitos, onde foi descrita pela primeira vez, mas também é de extrema importante para a homeostase celular das células vasculares (células endoteliais e células musculares lisas). As estatinas que possuem uma característica mais lipofílica (como a atorvastatina e a sinvastatina) podem se difundir de forma passiva através da bicamada lipídica da membrana celular e assim, podem se difundir para um grande número de células que não sejam apenas hepatócitos (59). A inibição de forma direta da prenilação das GTP-ases nas células vasculares constitui uma gama de hipóteses que explicam os vertiginosos efeitos pleiotrópicos das estatinas na parede vascular, que ocorrem de forma independente da redução de lipídios.

Além de todos os outros efeitos das estatinas citados anteriormente, também já foi descrito que levam a um aumento a morte celular induzida por quimioterápicos (60, 61), prejudicam a transição G1-S (62) e desencadeiam o processo de apoptose em células tumorais (63-67). E na contramão, os efeitos citoprotectores foram observados em células não malignas. Por exemplo, as estatinas reduziram a morte de células endoteliais humanas primárias (HUVECs), cardiomioblastos de ratos (H9c2) e de células musculares lisas após a administração de doxorrubicina e radiação ionizante *in vitro* (68, 69). Já *in vivo*, as estatinas aliviaram as respostas pro-inflamatórias e pro-fibrótica induzidas por radiação ionizante e conferiram uma proteção ao intestino contra o remodelamento fibrótico tecidual induzido por radioterapia, interferindo na sinalização da Rho (70, 71). As estatinas também conferem uma proteção ao tecido cardíaco e hepático normal das respostas agudas e subagudas induzidas por antraciclinas, ao passo que também aumentam a eficácia terapêutica anti-neoplásica da doxorrubicina em modelos de xenoenxerto (45, 72-74). Um dos alvos mais relevante para os efeitos cardioprotetores das estatinas é a Rho-GTPase-Rac1 (75)] e também parece ser particularmente relevante para a cardiotoxicidade aguda induzida por doxorrubicina, também (72, 76).

Até então, grande parte dos estudos tem demonstrados os efeitos benéficos das estatinas em relação à cardiotoxicidade aguda (em dias) e subaguda (até quatro semanas) após a administração de doxorrubicina (65, 72, 73). De forma geral, os estudos utilizam doses elevadas de doxorrubicina, o que coloca em xeque a relevância clínica dos dados. A dose de antraciclinas é extremamente relevante, pois

os mecanismos moleculares associados à cardiotoxicidade induzida pela DOX variam em a dose (77, 78). Os mecanismos fisiopatológicos associados à cardiotoxicidade aguda ou tardia após um regime quimioterápico com antraciclinas provavelmente se diferem uns dos outros (79, 80), não está bem claro se as estatinas são capazes de conferir uma cardioproteção contra a toxicidade tardia por antraciclinas.

Os mecanismos responsáveis pela cardio e vasoproteção induzida por estatinas ainda é área recente de investigação. Um estudo realizado com camundongos demonstrou que o pré-tratamento com lovastatina atenuou a depressão da função cardíaca induzida por doxorrubicina (45). Tais resultados foram atribuídos a efeitos anti-inflamatórios, evidenciados por uma menor expressão cardíaca de TNF-α; antioxidantes, corroborados por menor expressão cardíaca de nitrotirosina e aumento da expressão de superóxido dismutase 2; e antiapoptóticos, apresentando uma menor expressão de Bax (pró-apoptótica) e maior expressão de BCl-2 (antiapoptótica). Foi demonstrado que as estatinas também são capazes de suprimir a ativação do complexo pró-oxidante NAPDH oxidase ao inibir a prenilação de Rac pela menor formação de farnesilpirofosfato e geranilpirofosfato (81). Além da menor geração de EROs, as estatinas também aumentaram a defesa endógena antioxidante em células de músculo liso da artéria coronária (82), na qual uma das principais vias de transcrição é a que envolve o fator de transcrição Nrf2 (fator nuclear eritroide 2). O Nrf2, ao se dissociar de Keap1 no citosol, é translocado para o núcleo onde se liga ao elemento de resposta antioxidante (ARE), ativando a expressão de genes antioxidantes como heme oxigenase 1, glutationa S transferases e glutamato-cisteína ligases (83). As estatinas também exercem efeitos protetores vasculares pelo aumento da expressão e atividade da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), assim como também o seu acoplamento enzimático pela presença de cofatores, aumentando a biodisponibilidade de óxido nítrico (81).

Diante das evidências, parece plausível e sinérgico a inclusão das estatinas a um regime de quimioterapia por antraciclinas. Os estudos demonstram uma capacidade de minimizar os efeitos cardiotóxicos ao passo que não interferem na atividade antitumoral e pode até potencializar a eficácia das antraciclinas.

# 2 OBJETIVOS

## 2.1 Objetivos gerais

Avaliar como se dá a progressão da cardiomiopatia induzida por DOX e investigar a possível cardioproteção conferida por uma terapia adjuvante com rosuvastatina para minimizar os efeitos da toxicidade causada pela DOX.

## 2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos são:

a) avaliar como a doxorrubicina afetam:
- via apoptótica através da técnica de imunofluorescência TUNEL;
- morfologia cardíaca através da microscopia ótica e eletrônica;
- função cardíaca através da técnica de Langendorf;
- função vascular utilizando a técnica de reatividade vascular;
- Balanço redox (estresse oxidativo) por quantificação de marcadores de dano oxidativo e atividade das enzimas antioxidantes endógenas.

b) e avaliar a utilização de rosuvastatina como cardioprotetora analisando:
- morfologia cardíaca;
- função vascular;
- balanço redox;

# 3 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenhado de duas formas: O primeiro estudo, que denominamos de estudo A, foi para estudar a progressão da cardiomiopatia induzida pela DOX. Já o estudo B, foi realizado utilizando a rosuvastatina como intervenção terapêutica adjuvante com o intuito de prevenir a progressão da cardiomiopatia.

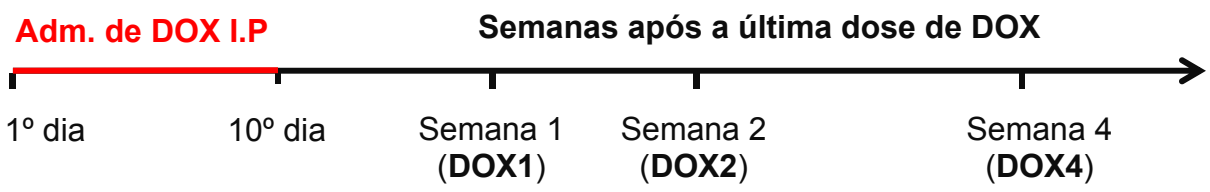
## 3.1 Estudo A – Progressão da cardiomiopatia induzida pela doxorrubicina

### 3.1.1 Delineamento experimental

Para o estudo (Figura 1), foram utilizados ratos Sprague-Dawley machos com 12 semanas de idade (n = 48) pesando aproximadamente 300 g onde eram mantidos em gaiolas com 4-5 animais. Todos os ratos foram mantidos em ciclos de 12 h claro e escuro com água e comida à vontade. Os animais dos grupos experimentais receberam injeções intraperitoneais de cloridrato de doxorrubicina (Adriblastina®, Pfizer, Brasil; 1 mg/kg por dia) durante 10 dias consecutivos, totalizando 10 mg/kg de DOX, exceto o grupo controle que recebeu o volume correspondente de NaCl 0,9% i.p. A eutanásia dos animais foi realizada uma semana (grupo DOX1), duas semanas (grupos DOX2) e quatro semanas após (DOX4) após a ultima dose de DOX com uma superdose de tiopental sódico (120 mg/kg) i.p.

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética local sob o protocolo n. CEUA 023/2015.

Figura 1 - Esquema do delineamento experimental do estudo A




Fonte: O autor, 2018.

3.1.2 Função ventricular esquerda em coração isolado

Após os animais serem anestesiados com tiopental (40 $mg.kg^{-1}$, i.p.), foi realizada uma esternotomia mediana e pericardiotomia, o coração foi removido e acoplado a um aparelho de coração isolado, de acordo com o método de Langendorff. O coração permaneceu sendo perfundido de forma retrógrada via circulação coronariana com solução de Krebs-Henseleit (mM: 118 NaCl, 4,7 KCl, 1,2 $MgSO_4$, 1,2 $KH_2PO_4$, 25 $NaHCO_3$, 10 glicose e 1,8 $CaCl_2$, pH 7,2; gasificado com 95% $O_2$ – 5% $CO_2$ a 37°C), recebendo um fluxo constante de 10 $mL.min^{-1}$, através de bomba peristáltica (AVS, São Carlos, SP, Brasil).

Após 30 min de período basal para estabilização do sistema e normalização da frequência cardíaca, os corações foram submetidos a estresse farmacológico com concentrações crescentes de norepinefrina ($10^{-9}$, $10^{-8}$, $10^{-7}$, $10^{-6}$, $10^{-5}$ M *in bolus*; Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil). O intervalo entre a administração das diferentes concentrações de norepinefrina foi de cinco minutos, suficiente para retorno aos valores basais.

Para monitorização da pressão do ventrículo esquerdo (VE), um balão de látex contendo solução fisiológica foi introduzido no VE através do átrio esquerdo, e acoplado a um transdutor de pressão e insuflado. Para análise, foi utilizado o LabChart 7.1.2 (ADInstruments Inc., Colorado Springs, CO, EUA). O balão foi inflado mantendo uma pressão diastólica final (PDF) entre 5-10 mm Hg no período basal. As seguintes variáveis foram obtidas: pico da pressão sistólica, PDF e pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo (PDVE; diferença entre o pico da pressão sistólica, PDF e dP/dt).

### 3.1.3 Microscopia de Luz

Fragmentos do ventrículo esquerdo foram depositados em uma solução de fixação (paraformoldeído tamponado a 10% preparada na hora) por 48 h em temperatura ambiente. Em seguida os fragmentos foram lavados em água corrente, seguindo pelo processo de desidratação em concentrações crescente de álcool etílico (70%, 90% e 100%). Continuando o processo, os fragmentos foram diafanizados em xilol e embebidos em parafina. Os fragmentos foram depois inclusos em Paraplast plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e seccionados em espessura de 5 µm. Os cortes que foram obtidos foram corados com hematoxilina-eosina, picro-sirius red (para analisar a morfologia do tecido e a distribuição de tecido conjuntivo, colágeno, respectivamente), coloração de Weigert ou utilizados para realização de imunohistoquímica e imunofluorescência. Foram analisados 7 campos aleatórios utilizando uma área test em 3 laminas por animal, onde foi realizado a segmentação por pixel, para determinar o percentual de área marcada utilizando o software Image Pro Plus 5.

### 3.1.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os fragmentos de tecido cardíaco (VE) obtidos foram fixados em glutaraldeído a 2,5% (Riedel-de-Haen, Alemanha) em um tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,3). Após o processo de fixação, as amostras foram lavadas em tampão de imidazol a 0,1 M (pH 7,5) e pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 2% em tampão de imidazol por 30 min (84), seguido de novas lavagens com tampão imidazol 0,1 M e posteriormente, iniciando o processo de desidratação. O processo de desidratação das amostras consistiu de uma série gradual de acetona (30%, 50%, 70% e 90% e duas vezes em 100%) e, em seguida, foram embebidas Epon. Os blocos de Epon contendo as amostras foram seccionados em cortes semifinos de 1 µm e corados com azul de toluidina (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e posteriormente observados em um microscópio de luz (Olympus BX 53F, Tóquio, Japão). Os cortes ultrafinos destinados a microscopia eletrônica foram realizados em um ultramicrótomo (Leica, Ultracut-UCT, Gmbh, Áustria) na

espessura de 70 nm e posteriormente contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. Posteriormente foram analisados em um microscópio eletrônico de transmissão da Zeiss (EM 906 Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) a 80Kv.

### 3.1.5 Imunifluorescência – TUNEL

O método de marcação de Nicks por dUTP (*dUTP nick end labeling – TUNEL*) é utilizado para detecção da fragmentação de DNA através da marcação da ponta terminal dos ácidos nucleicos. O final da via apoptótica foi avaliada pelo ensaio terminal de desoxinucleotidil transferase dUTP (Ensaio TUNEL Click-iT® Plus, Life Thermo Fisher Scientific Inc, EUA) em fragmentos do ventrículo esquerdo fixados em formalina e emblocados em parafina. Foram contabilizados o número de núcleos de cardiomiócitos fluorescentes que significa positivos para a marcação, dentro de uma área teste em 10 campos aleatório em duas laminas por animal (n=5). Utilizamos o software Image Pro Plus 5 (Media Cybernetics, Inc) para realizar a análise das imagens.

### 3.1.6 Isolamento do leito arterial mesentérico (LAM)

Após os animais serem anestesiados com tiopental sódico, foram submetidos a uma laparotomia para retirada do LAM, onde foi estendido para fora da cavidade abdominal e envolto em gazes embebidas com solução nutriente modificada de Krebs ($NaCl$, $KCl$, $CaCl_2.2H_2O$, $MgSO_4$, $NaHCO_3$, $KH_2PO_4$, $C_6H_{12}O_6$). Os ramos cólico direito da artéria mesentérica superior, ílio-cólico e pancreático-duodenal foram ligados e seccionados. O intestino delgado foi seccionado na altura do jejuno proximal e do íleo distal. A artéria mesentérica superior foi então isolada na sua origem, na altura da aorta abdominal e em seguida, foi canulada com um jelco 18 e preenchido com solução de Krebs heparinizada. Logo em seguida, o leito vascular mesentérico foi separado do intestino delgado, onde foi realizado cortes no leito rente a borda intestinal e a preparação foi lavada com a solução de Krebs modificado.

### 3.1.7 Mensuração da Reatividade do LAM às substancias vasoativas

Após o isolamento do LAM, a preparação foi colocada em um cuba de vidro e constantemente perfundida através de uma cânula que foi inserida na artéria mesentérica superior e em seguida conectada a uma bomba peristáltica (MiniPlus 3, Gilson®). A solução de Krebs perfundida foi mantida à 37ºC e gaseficada com uma mistura carbogênica (95% de $O_2$ e 5% de $CO_2$) sob um fluxo constante de 4 ml/min e a pressão de perfusão foi registrada continuamente através do software Labchart 7 Reader, por meio de um transdutor de pressão (PowerLab 4/30).

As análises se iniciaram após um período de 30 minutos de estabilização da preparação de LAM, onde a pressão de perfusão basal foi mantido em torno de 20-40 mmHg (85) e em seguida foram administrados 120 µm de KCl a cada 10 min para obter uma resposta consistente. Após a estabilização, inicia-se o período de sensibilização vascular, do qual a norepinefrina (NE) é adicionada juntamente com a solução de perfusão em concentrações (~30 µM) suficientes para que a pressão de perfusão se mantenha estável entre valores de 80-100 mmHg. Assim que é obtida a resposta pressórica induzida pela NE, testamos a capacidade do endotélio vascular de liberar NO através da infusão de ACh (em concentrações de 1-100 pM), no qual deverá produzir um efeito vasodilatador que é dependente da liberação de NO pelas células do endotélio vascular. Também foi avalizada a capacidade de vasodilatação direta do músculo liso vascular através da infusão de nitroglicerina (NG – em concentrações de 1-100 nM), uma substância doadora de NO que atua diretamente no musculo liso vascular sendo assim, um efeito independente do endotélio.

A resposta vasodilatadora foi expressa em porcentagem (%). As infusões "*in bolus*" das substâncias utilizadas no experimentos foram realizadas por meio de um injetor acoplado ao sistema de perfusão, através de micro-seringas de 10 – 100 µL (Hamilton). O intervalo entre as infusões foi de aproximadamente 5 minutos e o volume das substâncias infundidas variou entre 5-50 µL, o que permitiu sempre o retorno e estabilização da pressão de perfusão aos níveis basais.

### 3.1.8 Biomarcadores de estresse oxidativo

A mensuração da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxina (GPx) assim como os ensaios para marcadores de estresse oxidativo de peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas, foram realizados em amostras de homogeneizado de coração em tampão fosfato.

#### 3.1.8.1 Determinação da peroxidação lipídica

Os danos nas estruturas lipídicas de membrana foram quantificados pela formação de subprodutos da lipoperoxidação (malondialdeído – MDA), que são substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O MDA reage com o ácido tiobarbitúrico, gerando uma substancia rósea e posteriormente analisada por espectrofotometria. Este experimento em RBC foi uma adaptação da técnica de Draper et al.(86).

Foram adicionados 50 µl do homogeneizado de coração em 1000 µl de ácido tricloroacético 10%. As amostras foram centrifugadas a 10000 rpm, 4ºC, por 30 segundos. O sobrenadante foi misturado com ácido tiobarbitúrico a 0,67% e aquecido durante 30 minutos em banho seco a 100°C. Os níveis de TBARS foram determinados através da leitura do subproduto por absorbância a 532 nm (Fluostar Omega, BMG Labtech, Ortenberg, Germany), utilizando 1,1,3,3- tetrametoxi propano como padrão e concentração de TBARS foi expressa como nM/g de hemoglobina.

#### 3.1.8.2 Determinação da carbonilação de proteínas

A determinação da oxidação de proteínas foi realizada pelo método de Levine (87) que se baseia no princípio de que vários radicais livres atacam resíduos de proteínas produzindo produtos com o grupo carbonila, que podem ser medidos através da reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina. Os grupos carbonila formados foram

determinados por espectrofotometria com comprimento de onda de 370 nm utilizando um coeficiente 22.000 $Molar^{-1}$ em nmol/mg Hb.

### 3.1.9 Atividade das enzimas antioxidantes

A atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, glutationa peroxidase e catalase foram realizadas no homogeneizado de coração. Os resultados foram expressos por U/g de proteína.

#### 3.1.9.1 Atividade da enzima superóxido dismutase

A atividade da enzima superóxido dismutase foi realizada por um ensaio que determina a habilidade da enzima de inibir a autoxidação do pirogalol. O princípio desse método é baseado na competição entre a autoxidação do pirogalol pelo $O_2^{\cdot -}$ e o processo de "dismutação" do ânion superóxido (em $H_2O_2$) pela SOD de acordo com o método de Marklund et al. (88).

#### 3.1.9.2 Atividade da enzima catalase (CAT)

A catalase é uma hemeproteína que catalisa a degradação do $H_2O_2$. Na reação, uma das moléculas do $H_2O_2$ é oxidada a oxigênio molecular e a outra é reduzida à água (89). Foram utilizados 20 µL do homogeneizado de coração em cubetas de quartzo, onde adicionamos 1 mL de tampão fosfato (PBS) com peróxido de hidrogênio (25 mL de tampão para 40 µL de $H_2O_2$). A leitura foi realizada nos tempos 0, 30 e 60 segundos no comprimento de onda 240 nm (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific, USA).

#### 3.1.9.3 Atividade da enzima glutationa peroxidase (GPx)

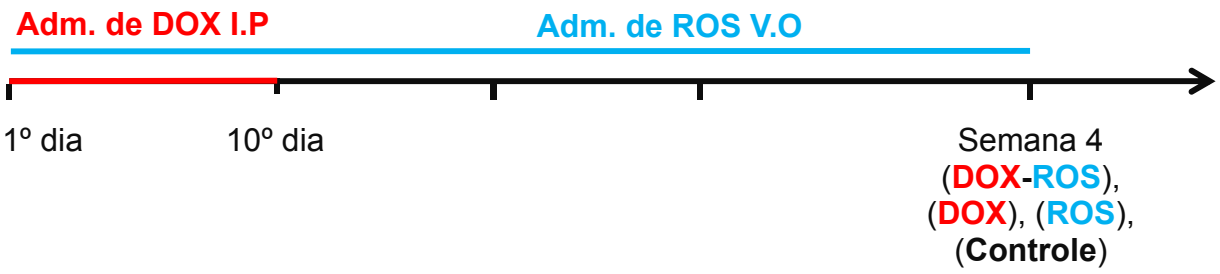
A enzima glutationa peroxidase oxida a glutationa reduzida (GSH), um tripeptídeo, na redução acoplada de $H_2O_2$ a $H_2O$ de acordo com o protocolo de Paglia e Valentine (90). Adicionamos 50 µL do homogeneizado em uma solução (PBS) e incubamos por 10 minutos. Em seguida, adicionamos 200 µL NADPH mais 200 µL de $H_2O_2$, homogeneizamos e realizamos a leitura por espectrofotometria em 340 nm de comprimento de onda por 5 min com intervalos de 10 segundos (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific, USA).

## 3.2 **Estudo B – Tratamento adjuvante com Rosuvastatina**

### 3.2.1 Delineamento experimental

No estudo B (Figura 2), utilizamos 48 ratos Sprague-Dawley, com 12 semanas de idade e 300 g de massa aproximadamente. Os animais foram divididos em grupo rosuvastatina (ROS), que recebeu por gavagem rosuvastatina cálcica (20 mg/kg de peso – Crestor) durante 5 semanas e 3 dias, o grupo rosuvastatina/doxorrubicina (DOX-ROS) recebeu 1 mg/kg por dia via i.p. de DOX durante 10 dias consecutivos e 20 mg/kg por dia de ROS por gavagem durante os 10 dias de DOX + 4 semanas. O grupo DOX foi idêntico ao grupo DOX4 do estudo A e um grupo controle, onde os animais receberam injeção intraperitoneal de NaCl similar ao esquema da DOX e água por gavagem, similarmente aos esquemas da ROS. No final, os animais foram induzidos a eutanásia da mesma forma que o estudo A (Figura 1).

Figura 2 - Esquema do delineamento experimental do estudo B




Fonte: O autor, 2018.

### 3.2.2 Experimentos

Os experimentos de microscopia de luz, o isolamento de leito arterial mesentérico (LAM), a mensuração da reatividade do LAM às substâncias vasoativas, biomarcadores de estresse oxidativo e atividade das enzimas antioxidantes foram descritas respectivamente, nas seções, 2.1.3, 2.1.6 e 3.1.7, 2.1.8 e 2.1.9.

### 3.2.3 Imunohistoquímica

Os fragmentos de ventrículo esquerdo foram fixados em formaldeído 4%, incorporados em parafina e seccionados numa espessura de 5 µm. As secções foram então incubadas com os anticorpo primário α-Actin (SM-1 – SC-130617 – Santa Cruz), seguido do anticorpo secundário biotinilado (K400611, Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca), estreptavidina-peroxidase e finalmente 3,3-diamino-benzidina (DAB) ( K3466, Dako Cytomation). As seções foram então coradas com hematoxilina de Mayer e montadas com Entellan. Para quantificar a o percentual de área marcada pelo o anticorpo nos grupos, 10 campos aleatórios por animal foram capturados usando um microscópio AXIO SCOPE com uma câmera AXIOCAM HRc (Carl Zeiss AG, Jena, Alemanha) em uma ampliação de 40 × e posteriormente analisado com Image Pro Plus 5.1 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA) por segmentação de pixel, onde foi determinado o percentual de área marcada em duas laminas por animal (n=5). Os

dados foram expressos em porcentagem média de área de tecido em que a proteína foi expressa ± o erro padrão da média.

## 3.3 **Análise estatística**

Os dados foram apresentados em média ± erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram testadas pela análise de variância (ANOVA) para avaliar se há diferença entre os grupos nos diversos experimentos realizados, exceto os experimentos de reatividade vascular e de coração isolado (langendorff) que utilizamos um ANOVA de múltiplas comparações. Após avaliar as hipóteses que assumem a normalidade e a esfericidade dos dados. O nível de significância foi fixado em 5% e a análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 6 (GraphPad Inc., CA, USA).

# 4 RESULTADOS

## 4.1 Estudo A – Progressão da cardiomiopatia induzida por doxorrubicina

### 4.1.1 Massa corporal

Os dados relativo a massa corporal (MC), massa do ventrículo esquerdo (VE) e do coração total (CT) estão representados no Quadro 3, onde podemos observar que houve uma redução significativa da massa corporal no grupo DOX2 (13,3%) e DOX4 (22,9%) em relação ao grupo controle ($p$>0,05). Já a massa do VE foi significativamente menor apenas no grupos DOX1. A massa do CT foi menor nos grupos DOX2 (14,2%) e DOX4 (11,9%) comparado com o grupo controle, enquanto o grupo DOX1 não apresentou diferente significativa.

Quadro 3 - Valores referentes a massa corporal (MC), ventrículo esquerdo (VE) e coração total (CT) dos grupos experimentais do estudo A

| | **Controle** | **DOX1** | **DOX2** | **DOX4** |
|---|---|---|---|---|
| **MC (g)** | 481 ± 0,011 | 431 ± 0,009 | 392 ± 0,007* | 372 ± 0,007* |
| **CT (g/mm)** | 0,042 ± 0,001 | 0,039 ± 0,003 | 0,036 ± 0,003* | 0,037 ± 0,001* |
| **CT (g)** | 1,521 ± 0,042 | 1,419 ± 0,104 | 1,305 ± 0,110* | 1,361 ± 0,059* |
| **VE (g/mm)** | 0,020 ± 0,001 | 0,018 ± 0,001* | 0,019 ± 0,001 | 0,019 ± 0,001 |
| **VE (g)** | 0,748 ± 0,060 | 0,670 ± 0,049* | 0,712 ± 0,052 | 0,711 ± 0,044 |

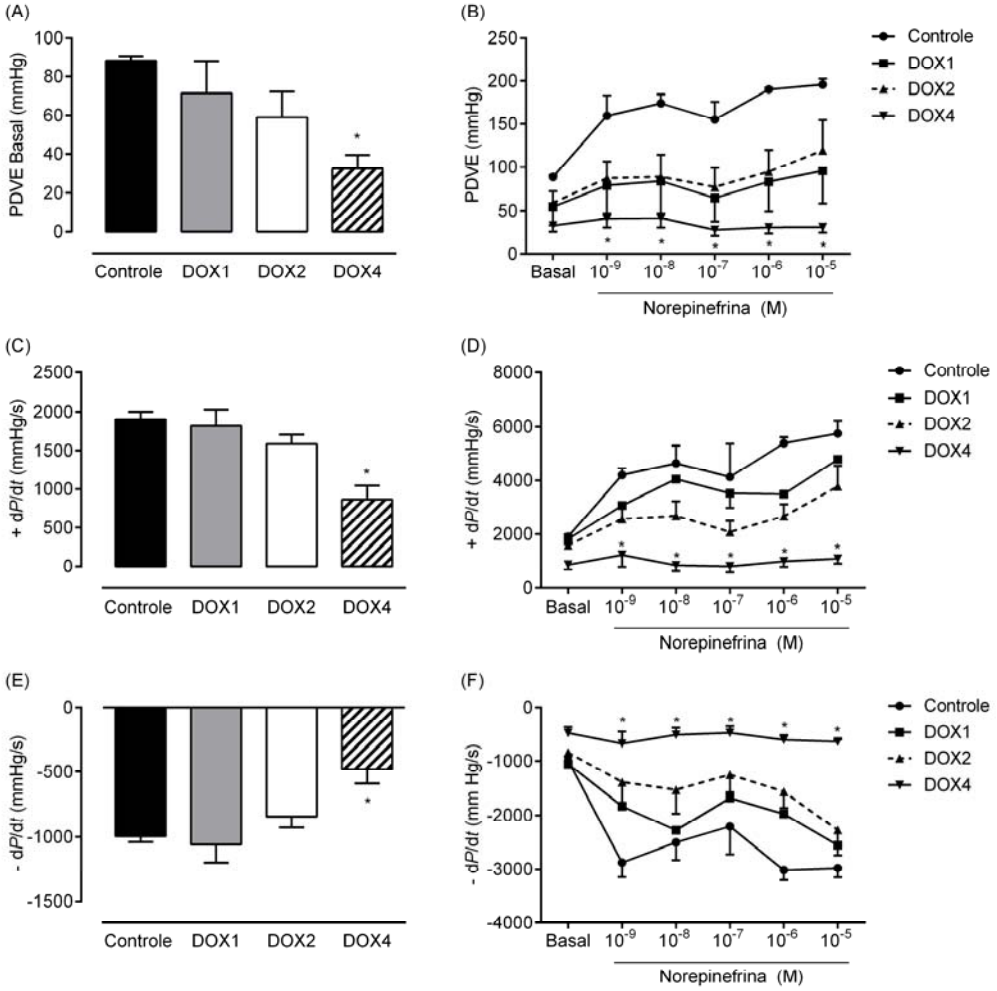
Legenda: Grupos Controle, DOX1, doxorrubicina 1 semana; DOX2, doxorrubicina 2 semanas; DOX4, doxorrubicina 4 semanas. (*) diferente do controle, ANOVA e $P \leq 0,05$.
Fonte: O autor, 2018.

### 4.1.2 Efeito da administração de doxorrubicina sobre a função cardíaca

A contração (avaliado pela PDVE e +d$P$/d$t$) e o relaxamento (avaliado pelo –d$P$/d$t$) do ventrículo esquerdo foram significativamente prejudicadas apenas após quatro semanas (DOX4) depois da última dose de doxorrubicina administrada.

A resposta cardíaca ao estímulo adrenérgico foi medida através de diferentes concentrações de norepinefrina. A doxorrubicina levou a uma diminuição da resposta aos estímulos adrenérgicos tanto na capacidade contrátil (Figura 3 – C e D) quanto na de relaxamento (Figura 3 – E e F), mas observamos diferença estatística apenas quando comparamos o grupo controle com o grupo DOX4.

Figura 3 – Efeitos da doxorrubicina sobre os parâmetros hemodinâmicos basais (esquerda) e a resposta cardíaca sob o estímulo adrenérgico com norepinefrina (direita)



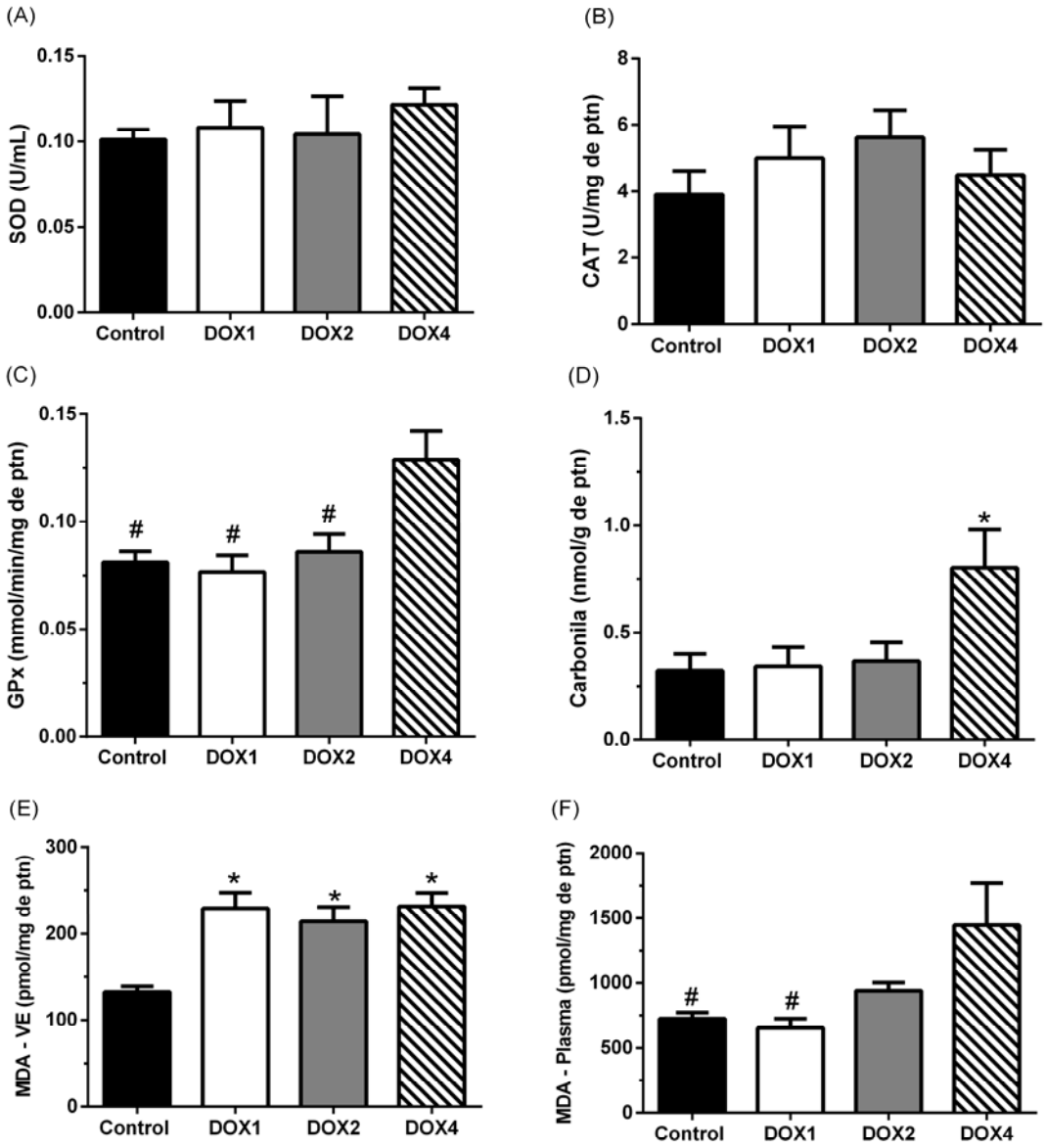

Legenda: PDVE, pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo. (*) diferente do grupo controle. ANOVA one-way. *P* <0,05

Fonte: O autor, 2018.

### 4.1.3 Efeito da administração de doxorrubicina sobre os parâmetros de estresse oxidativo no tecido cardíaco

O aumento da peroxidação lipídica no ventrículo esquerdo foi observado após o término da administração de doxorrubicina na primeira semana (DOX1) em comparação com o grupo controle e se manteve aumentado até a quarta semana (DOX4, Figura 4–E). Por outro lado, o dano oxidativo em estruturas proteicas ficou evidente apenas após a quarta semana (DOX4, Figura 4-D). A atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT (Figura 4 – A e B) não se alterou após a administração de doxorrubicina. No entanto, a atividade da glutationa peroxidase foi significativamente maior no grupo DOX4 quando comparada com todos os outros grupos (Figura 4 – C). O marcador de peroxidação lipídica circulante (plasma) demonstrou níveis similares entre o grupo controle e DOX1, no entanto foi maior no grupo DOX4 quando comparado com o grupo controle e DOX1 (Figura 4 – F).

Figura 4 – Efeito da administração de doxorrubicina sobre a atividade das enzimas antioxidantes endógenas e marcadores de estresse oxidativo no tecido cardíaco e no plasma



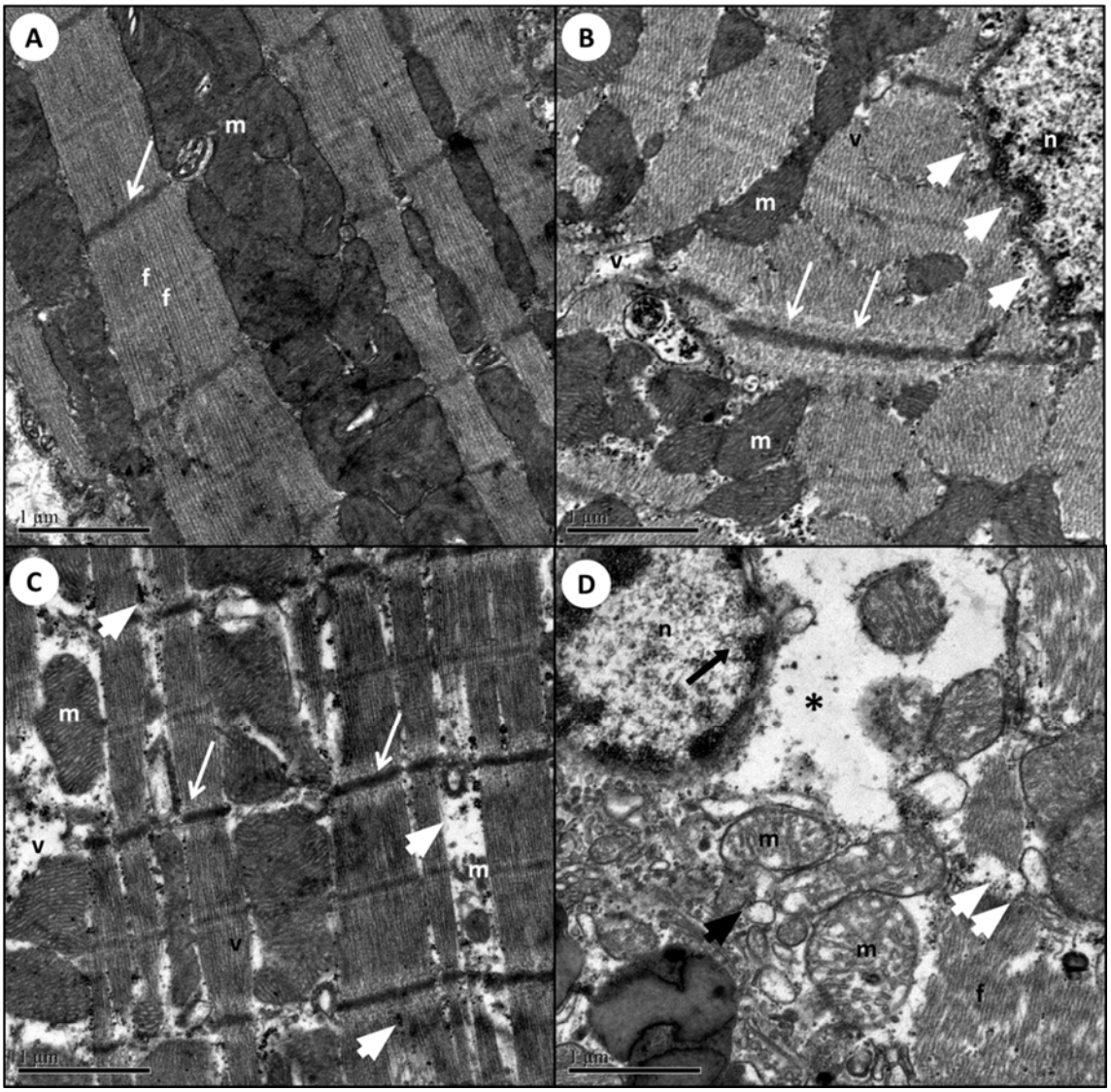

Legenda: Atividade da enzima superóxido dismutase (A), atividade da catalase (B), Atividade da glutationa peroxidase (C), formação de grupos carbonila (D), marcador de peroxidação lipídica no tecido cardíaco do ventrículo esquerdo (E) e no plasma (F). Análise estatística ANOVA one-way. Valores expressos em média ± EPM, n=8-10, (#) diferente do grupo DOX; (*) diferente do grupo controle. *P*<0,05.

Fonte: O autor, 2018.

### 4.1.4 Efeito da administração de doxorrubicina sobre a ultraestrutura dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo

A administração de doxorrubicina levou a um dano expressivo do miocárdio, como demonstrado na Figura 5. As alterações ultraestruturais começam a ser observadas já na primeira semana após a última dose administrada de doxorrubicina. Nos grupos DOX1 (Figura 5B) e DOX2 (Figura 5C) é possível observar um espessamente da linha Z, uma deposição de glicogênio perinuclear e interfibrilar, a formação de vacúolos e uma distribuição anormal das mitocôndrias quando comparamos com as mitocôndrias dispostas normalmente nos cardiomiócitos do grupo controle (Figura 5 A). Foi possível observar um dano mais extenso no grupo DOX4 (Figura 5D), onde após a quarta semana da última dose administrada de doxorrubicina, as mitocôndrias estão edemaciadas e apresentando uma desorganização estrutural, também observamos uma grande área de matriz extracelular, vacúolos perimitocondriais e depósitos expressivos de glicogênio, o núcleo apresenta características apoptóticas com desorganização da cromatina.

Figura 5 – Micrografia de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo de animais controle e tratados com doxorrubicina, obtidas em microscópio eletrônico de transmissão



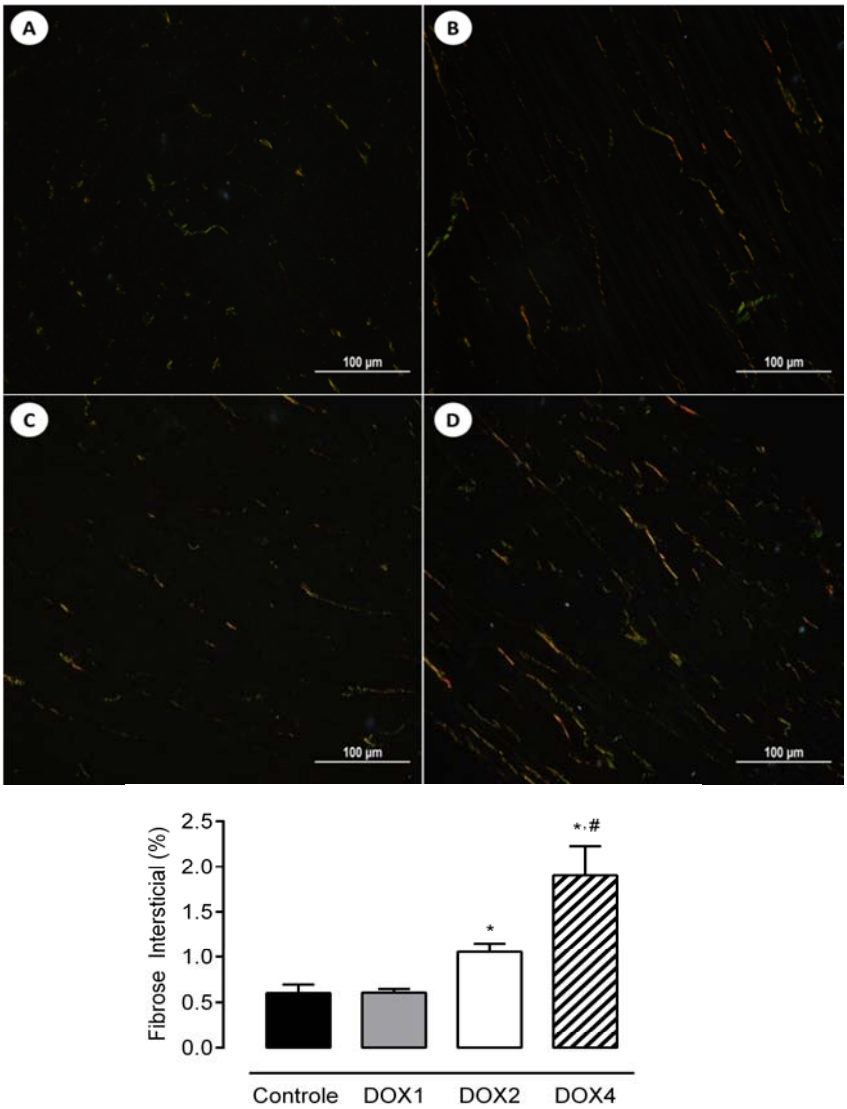

Legenda: (A) Controle, (B) DOX1, (C) DOX2 e (D) DOX4. Imagem ampliada 20.000 x. Seta brancas (linhas Z); cabeça de seta branca, depósitos de glicogênio; V, vacúolos; M, mitocôndrias; (*), matriz extracelular; cabeça de seta preta, vacúolos perimitocondrial; N, núcleos.

Fonte: O autor, 2018.

### 4.1.5 Efeito da administração de doxorrubicina sobre a deposição de fibras colágeno no tecido cardíaco e indução da apoptose

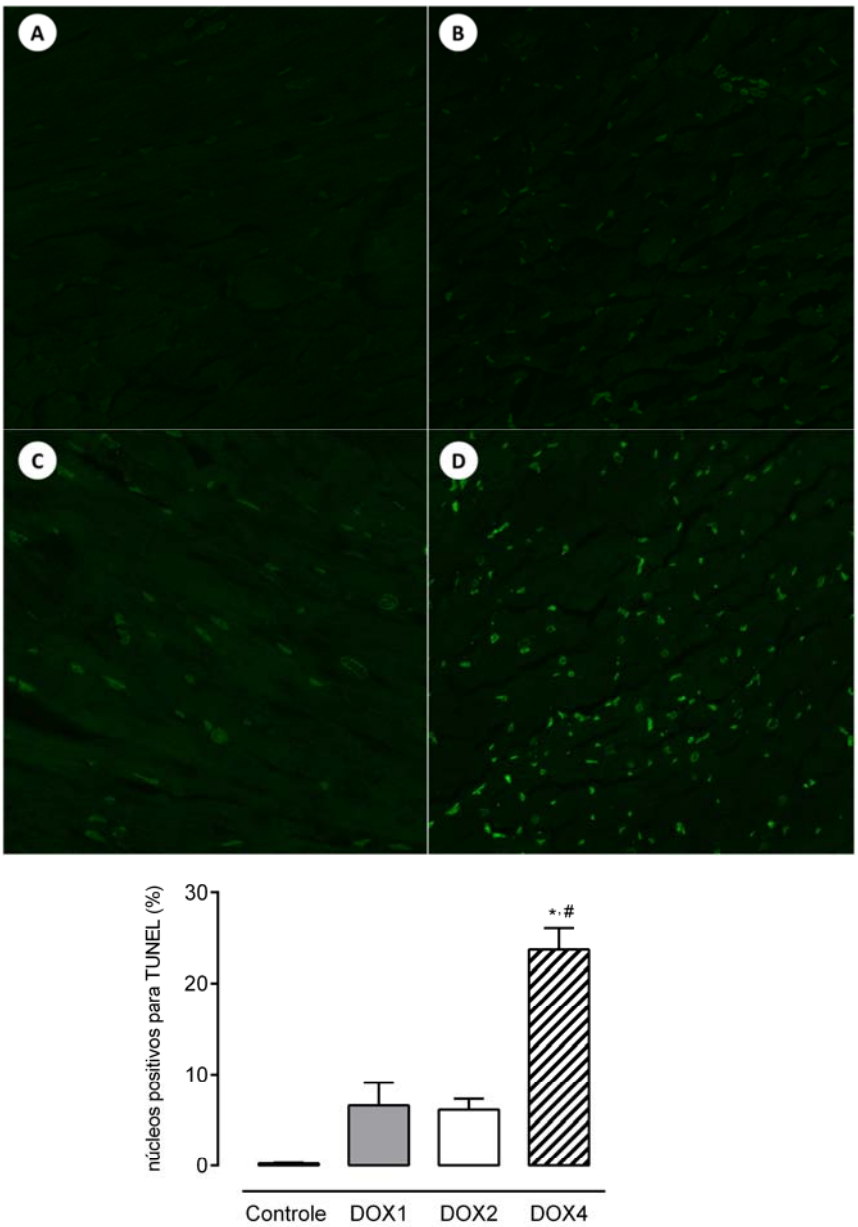
A fibrose intersticial no miocárdio aumentou de forma progressiva após o término da administração de DOX, onde foi possível observar esse achado com um aumento do percentual de área marcada por pixel, utilizando a técnica de picro sirius red (Figura 6). A marcação de núcleos apoptóticos através da técnica de TUNEL se mostrou ausente nos cardiomiocitos do grupo controle e os números de núcleos marcados foram gradualmente maiores com o passar do tempo, mas a diferença estatística só foi observada apenas no grupo DOX4 comparado ao grupo controle (Figura 7).

Figura 6 – Efeito da administração de doxorrubicina sobre a marcação de fibras colágeno sob luz polarizada no tecido cardíaco (Técnica de coloração de Picro Sirius Red)




Fonte: O autor, 2018.

Figura 7 – Efeito da administração de doxorrubicina sobre a marcação de núcleos apoptóticos no tecido cardíaco (Técnica de imunofluorescência TUNEL)



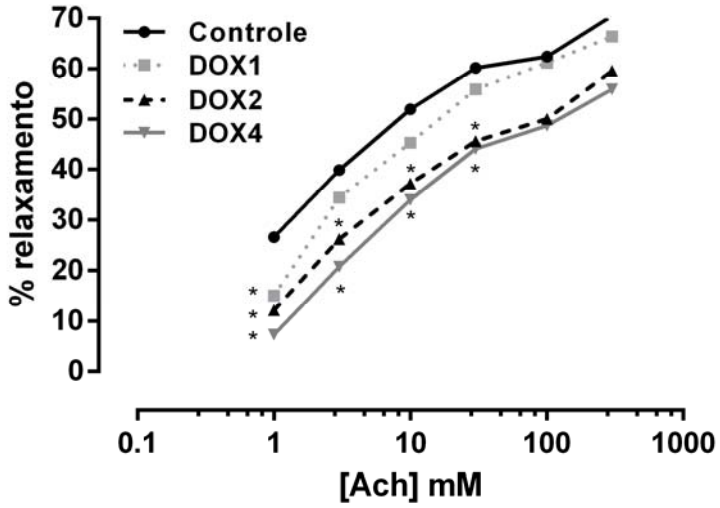

Legenda: Grupo Controle (A), Grupo DOX1 (B), Grupo DOX2 (C) e grupo DOX4 (D). Imagens obtidas sob a objetiva de 40x. Análise estatística através do teste ANOVA one-way. Valores expressos em média ± EPM, n=6, # diferente do grupo DOX; * diferente do grupo Controle. Imagens obtidas sob a objetiva de 40x.

Fonte: O autor, 2018.

### 4.1.6 Efeito da administração de doxorrubicina sobre a resposta vasodilatadora induzida por acetilcolina e nitroglicerina no leito arterial mesentérico (LAM)

A acetilcolina (Ach) foi capaz de produzir uma resposta vasodilatadora dose-dependente que foi significativamente menor ($p<0,05$) no leito arterial mesentérico nos animais dos grupos DOX1, DOX2 e DOX4 na dose de 1 mM e nas doses de 3, 10 e 30 mM, apenas nos grupos DOX2 e DOX4 quando comparados ao controle. Esses resultados demonstram um piora progressiva na resposta vasodilatadora induzida pela Ach nos vasos do LAM (Gráfico 1).

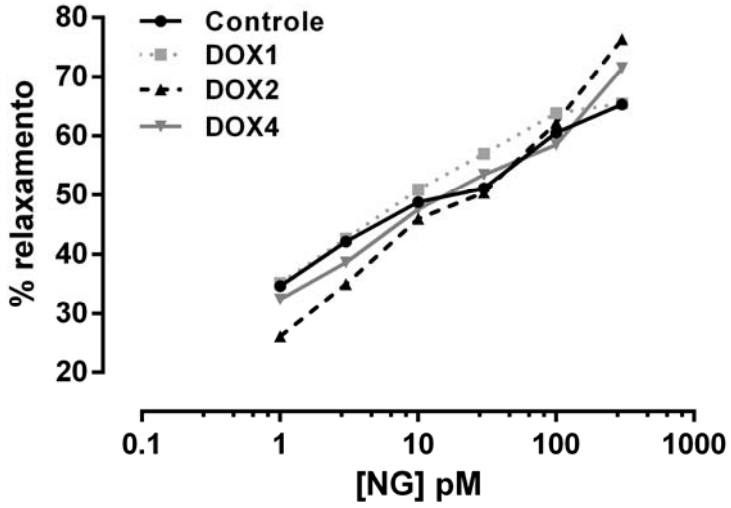
Gráfico 1 –Efeito da administração de doxorrubicina sobre a resposta vasodilatadora da acetilcolina (Ach) no LAM de animais




Nota: Valores expressos em média ± EP, n=8 por grupo. (*) diferente do grupo controle, $p<0,05$.
Fonte: O autor, 2018.

Não foi observado alteração na resposta vasodilatadora induzida pela NG em LAM dos animais em todos os grupos estudados.

Gráfico 2 - Efeito da administração de doxorrubicina sobre a resposta vasodilatadora da nitroglicerina no LAM de animais




Legenda: Valores expressos em média ± EP, n=8 por grupo.
Fonte: O autor, 2018.

## 4. 2 **Estudo B – Tratamento Adjuvante com Rosuvastatina**

### 4.2.1 Massa Corporal, massa do ventrículo esquerdo e do coração

Os dados relativos à massa corporal (MC), massa do ventrículo esquerdo (VE) e do coração total (CT) estão representados na Tabela 1, onde podemos observar que houve uma redução significativa da massa corporal no grupo DOX e DOX-ROS em relação ao grupo controle e ao grupo ROS ($p$>0,05). O mesmo foi observado na massa do VE e CT, onde houve uma redução significativa nos grupos DOX e DOX-ROS em relação ao grupo controle e ROS.

Tabela 1 – Valores referentes a massa corporal (MC), ventrículo esquerdo (VE) e coração total (CT) dos grupos experimentais do estudo B

| | Controle | ROS | DOX | DOX-ROS |
|---|---|---|---|---|
| **MC (g)** | 413 ± 16,2 | 402 ± 13,4 | 303 ± 15,1*,# | 308 ± 10,7*,# |
| **CT (g/mm)** | 0,023 ± 0,001 | 0,023 ± 0,001 | 0,016 ± 0,001*,# | 0,015 ± 0,001*,# |
| **CT (g)** | 1,154 ± 0,031 | 1,131 ± 0,041 | 0,817 ± 0,037*,# | 0,836 ± 0,040*,# |
| **VE (g/mm)** | 0,015 ± 0,001 | 0,015 ± 0,001 | 0,011 ± 0,001*,# | 0,010 ± 0,001*,# |
| **VE (g)** | 0,744 ± 0,026 | 0,744 ± 0,035 | 0,548 ± 0,027*,# | 0,508 ± 0,050*,# |

Legenda: Grupos Controle, ROS, rosuvastatina; DOX, doxorrubicina 4 semanas; DOX-ROS, doxorrubicina + rosuvastatina. (*) ≠ do controle, (#) ≠ de ROS, ANOVA e $P \leq 0,05$.
Fonte: O autor, 2018.

### 4.2.2 Efeito da intervenção com rosuvastatina sobre os parâmetros de estresse oxidativo em animais que receberam doxorrubicina em tecido cardíaco

Foi observado uma redução na formação de subprodutos (malondialdeído – MDA) da peroxidação lipídica nas amostras de tecido cardíaco em animais do grupo controle, ROS e DOX-ROS quando comparados ao grupo DOX (Figura 7-B). O tratamento adjuvante com ROS foi capaz de prevenir a formação de MDA no grupo DOX-ROS quando comparado ao grupo DOX ($p<0,05$).

Observamos uma redução significativa ($p<0,05$) na carbonilação de proteínas nas amostras de coração do grupo controle, ROS e DOX-ROS quando comparados com o grupo DOX. Os resultados mostram que o tratamento adjuvante com ROS foi capaz de conter a formação de grupamentos carbonila no grupo DOX-ROS quando comparado ao grupo DOX (Figura 8-A).

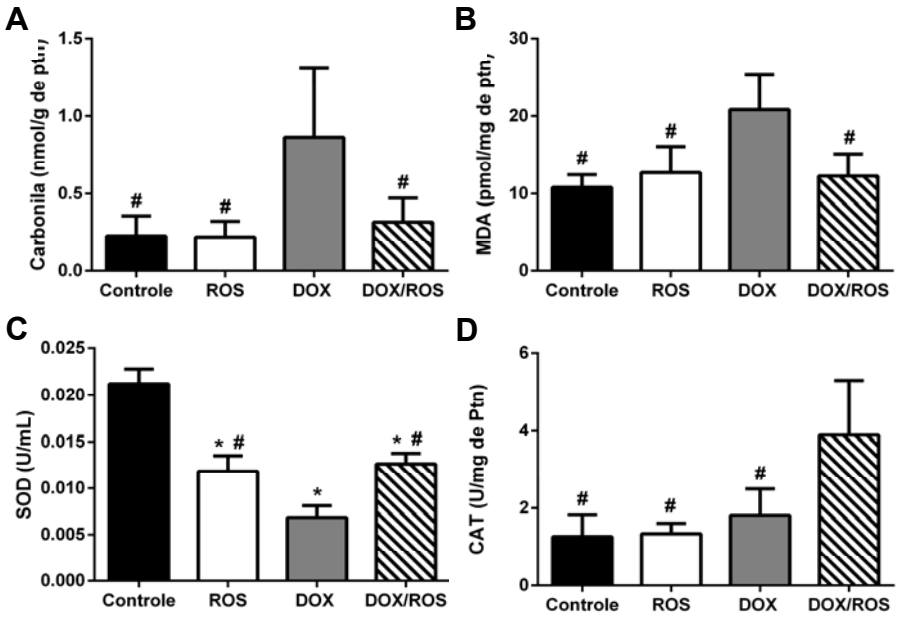
A atividade da enzima antioxidante SOD (Figura 8-C) foi significativamente maior em amostras de tecido cardíaco no grupo DOX-ROS quando comparado com o grupo DOX, mostrando que o tratamento adjuvante foi capaz de aumentar a atividade da enzima ($p<0,05$). Quando comparado com o grupo controle, todos os outros grupos a atividade da SOD foi significativamente menor ($p<0,05$).

A atividade da enzima catalase foi significativamente maior ($p<0,05$) em amostras de tecido cardíaco no grupo DOX-ROS quando comparada com o grupo DOX (Figura 8-D), assim como também com os grupos controle e ROS. O tratamento

adjuvante com ROS foi capaz de aumentar a atividade da enzima catalase nestas amostras dos animais com cardiomiopatia induzida por ROS.

Dessa forma observamos que o uso de rosuvastatina foi capaz de reduzir os níveis dos marcadores de estresse oxidativo como a peroxidação lipídica e também a produção de grupos carbonila. Essa possível redução pode ter sido como consequência do aumento da atividade das enzimas antioxidantes endógenas catalase e superóxido desmutase, onde o grupo que sofreu intervenção com a doxorrubicina e tratado concomitantemente com rosuvastatina (DOX-ROS) apresentou maiores níveis de atividade dessas enzimas quando comparado com o grupo que sofreu intervenção com a doxorrubicina apenas (DOX).

Figura 8 – Efeito do tratamento com rosuvastatina sobre a atividade das enzimas antioxidantes endógenas e marcadores de estresse oxidativo no tecido cardíaco de animais com cardiomiopatia induzida por doxorrubicina



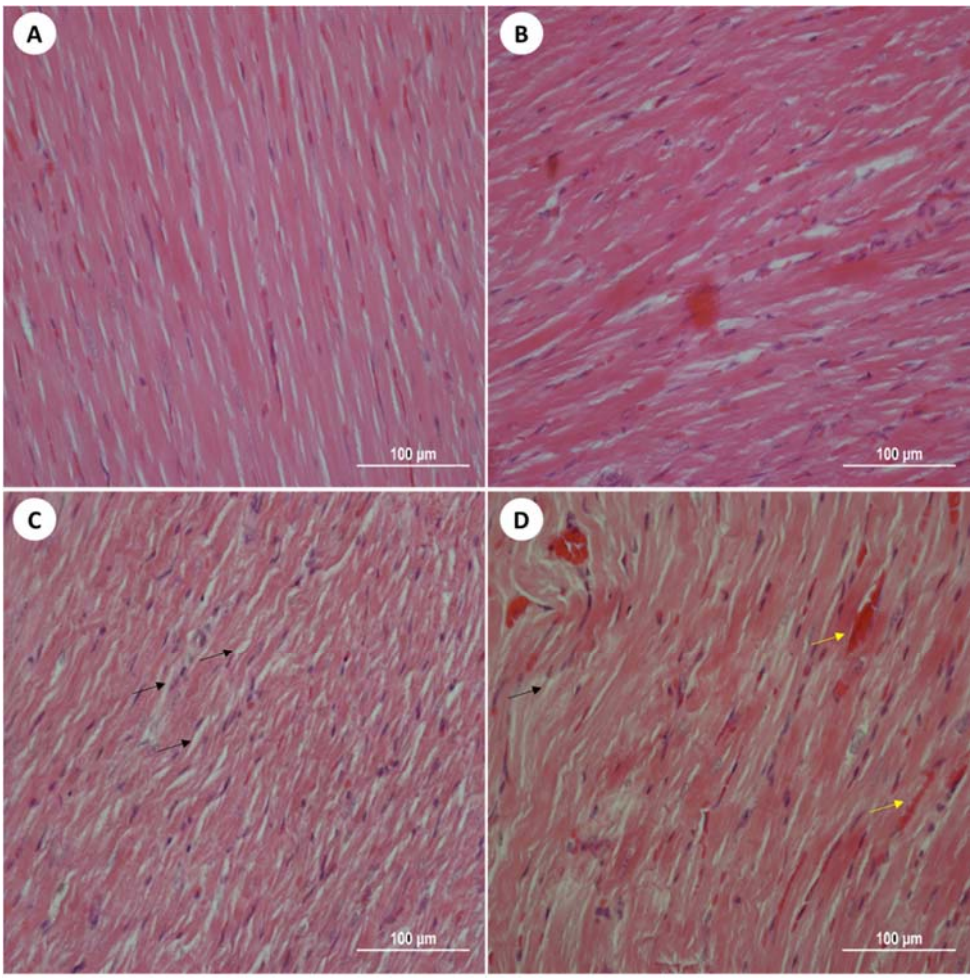

Legenda: Formação de grupos carbonila (A), marcado de peroxidação lipídica por TBARS (B), atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase - SOD (C) e catalase - CAT (D). Análise estatística através do teste ANOVA. Valores expressos em média ± EPM, n=8-10, (#) diferente do grupo DOX; (*) diferente do grupo controle. *P*<0,05.

Fonte: O autor, 2018.

4.2.3 Papel protetor da Rosuvastatina sobre a morfologia do tecido cardíaco

Na Figura 9 podemos observar cortes histológicos representativos sob a coloração de hematoxilina e eosina (HE) dos grupos controles (A), ROS (B), DOX (C) e DOX-ROS (D), onde não observamos grande alterações morfológicas. No grupo DOX e DOX-ROS podemos observar uma rarefação miofibrilar difusa como também retração nuclear e espaços entre os miofilamentos (setas pretas) o que sugere certo grau de atrofia das miofibrilas, desorganização e fragmentação. Tais alterações são sugestivas de degeneração tecidual. Também observamos áreas de vacuolização citoplasmática e hemorragia tecidual (seta amarela) evidenciando algum nível de congestão tecidual.

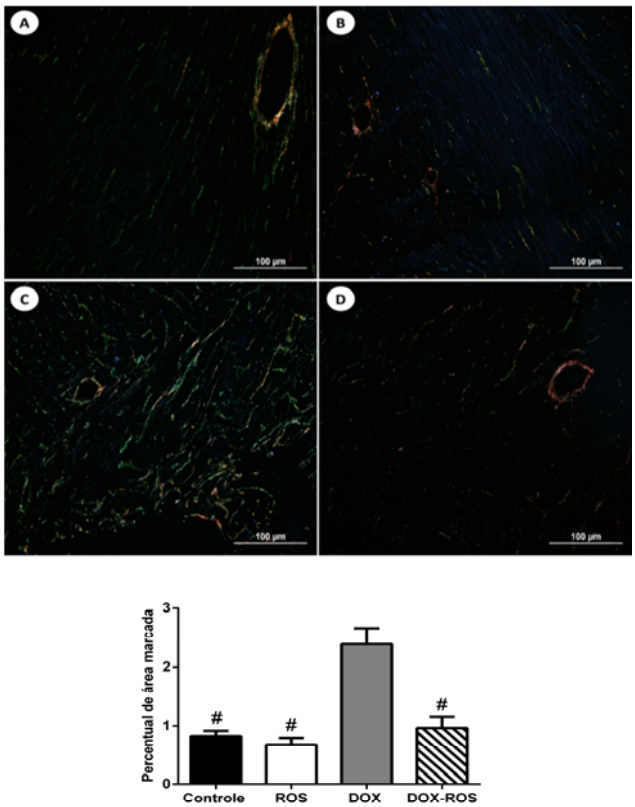
Figura 9 – Fotomicrografias de tecido miocárdico coradas com hematoxilina e eosina (H&E) sob o aumento de 40x




Fonte: O autor, 2018.

Na Figura 10 podemos observar fotomicrografias obtidas através da técnica de picro-sirius red sob luz polarizada, onde as áreas em tons de amarelo, verde e vermelho representam depósitos de fibras colágenos. Diante dessas imagens podemos observar no grupo DOX (C) uma grande área marcada no tom esverdeado, sugestivo de uma quantidade aumentada dos depósitos de fibras de colágeno e que aparentemente a intervenção com rosuvastatina parece atenuar a deposição de fibras colágeno do interstício miocárdio (grupo DOX-ROS – D). Após esta observação, realizamos a quantificação do percentual de área marcado pelo programa Image Pro Plus 5 e posterior a análise estatística dos valores obtidos, evidenciando que o grupo DOX teve um aumento significativo da área marcada de fibras colágeno em relação a todos os outros grupos (Figura 9 - $p<0,05$).

Figura 10 – Efeito do tratamento com rosuvastatina sobre a marcação de fibras colágeno sob luz polarizada em animais com cardiomiopatia induzida por doxorrubicina. Técnica de coloração de Picro Sirius Red

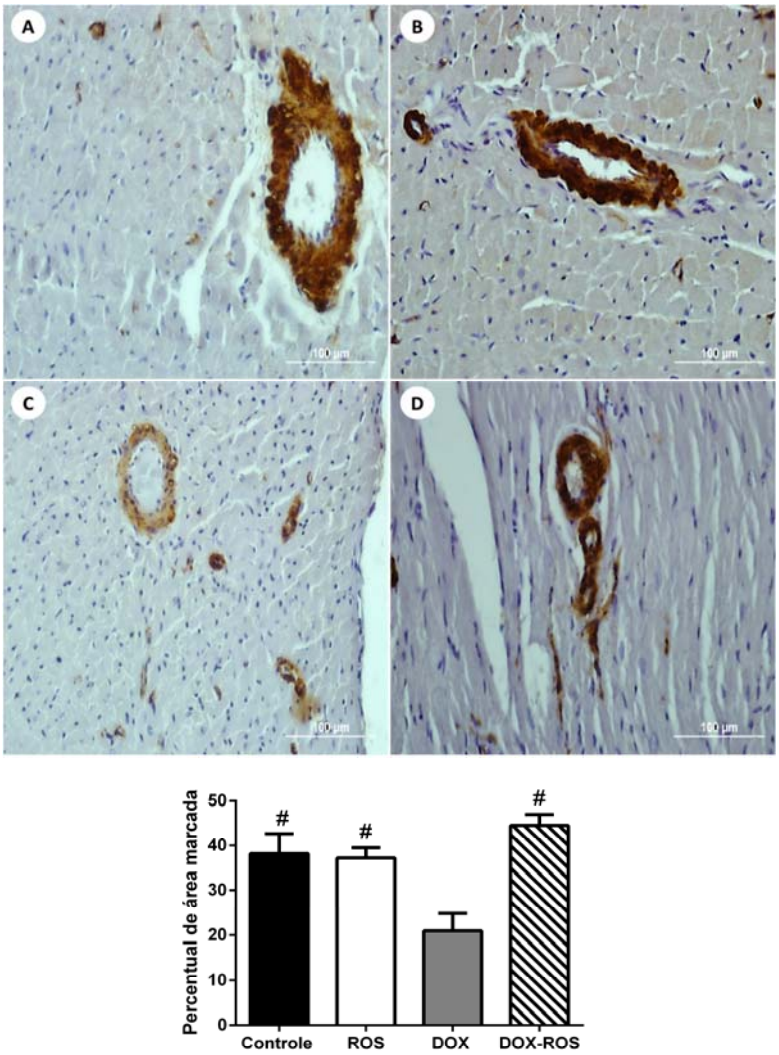



Legenda: Grupo Controle (A), Grupo ROS (B) Grupo DOX (C) e grupo DOX-ROS (D). Imagens obtidas sob a objetiva de 40x. Análise estatística através do teste ANOVA one-way. Valores expressos em média ± EPM, n=6, # diferente do grupo DOX. Imagens obtidas sob a objetiva de 40x.

Fonte: O autor, 2018.

As fotomicrografias representadas na Figura 11 representam uma imunomarcação de α-actina de músculo liso, presente nos vasos arteriais do miocárdio. Podemos observar que no grupo DOX (C), houve uma diminuição na intensidade de marcação da α-actina de músculo liso. Já no grupo DOX-ROS, o tratamento com rosuvastatina preservou a marcação de α-actina, o que foi estatisticamente diferente o grupo DOX em relação aos outros ($p$<0,05).

Figura 11 – Efeito do tratamento com rosuvastatina sobre a marcação de α-actina de músculo liso na microcirculação cardíaca em animais com cardiomiopatia induzida por doxorrubicina



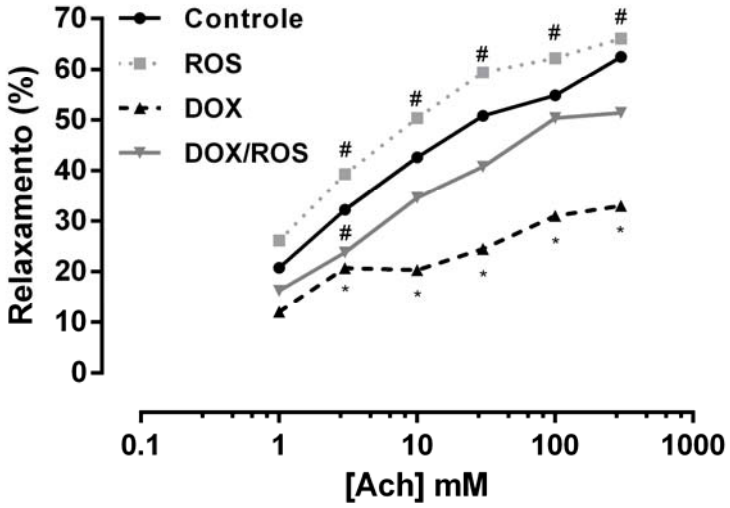

Legenda: Grupo Controle (A), Grupo ROS (B), Grupo DOX (C) e grupo DOX-ROS (D). Análise estatística através do teste ANOVA one-way. Valores expressos em média ± EPM, n=6, # diferente do grupo DOX. Imagens obtidas sob a objetiva de 40x.

Fonte: O autor, 2018.

### 4.2.4 Efeito do tratamento adjuvante com rosuvastatina sobre a resposta vasodilatadora induzida por acetilcolina e nitroglicerina em animais com cardiomiopatia induzida por doxorrubicina

A acetilcolina (Ach) foi capaz de produzir uma resposta vasodilatadora dose-dependente que foi significativamente ($p<0,05$) menor no leito arterial mesentérico nos animais do grupo DOX, quando comparados ao controle. O tratamento adjuvante com rosuvastatina se mostrou benéfico ao aumentar significativamente a resposta vasodilatadora da Ach nos animais com cardiomiopatia induzida por doxorrubicina (Gráfico 3).

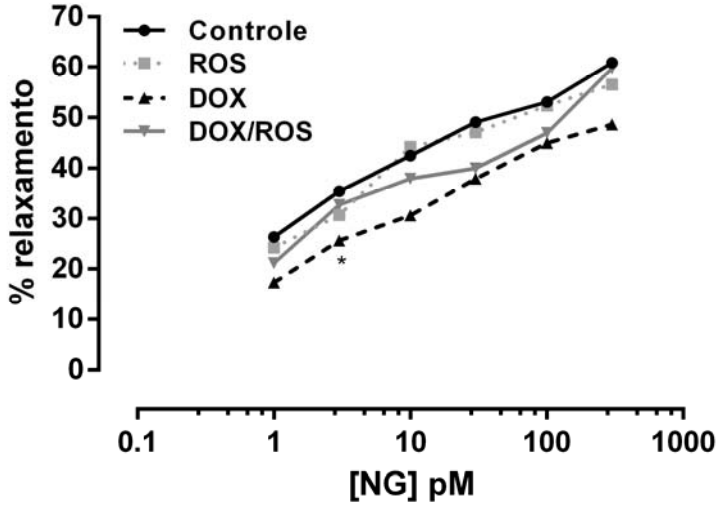
Gráfico 3 – Efeito do tratamento adjuvante com Rosuvastatina sobre a resposta vasodilatadora da acetilcolina (Ach) no LAM de animais com cardiomiopatia induzida por doxorrubicina




Legenda: Valores expressos em média ± EP, n=8 por grupo. (*) diferente do grupo controle, (#) diferente do grupo DOX, $p<0,05$.
Fonte: O autor, 2018.

Não observamos alteração na resposta vasodilatadora induzida pela NG em LAM dos animais em todos os grupos estudados. Apenas houve um redução significativa da vasodilatação induzida pela dose de 3 nM de NG no grupo DOX em comparação ao grupo controle ($p<0,05$).

Gráfico 4 - Efeito do tratamento adjuvante com Rosuvastatina sobre a resposta vasodilatadora da nitroglicerina no LAM de animais com cardiomiopatia induzida por doxorrubicina




Legenda: Valores expressos em média ± EP, n=8 por grupo. (*) diferente do grupo controle.
Fonte: O autor, 2018.

# 5 DISCUSSÃO

Neste trabalho buscamos caracterizar as alterações morfológicas e funcionais cardíacas induzidas pela doxorrubicina. Um achado importante do estudo foi que a administração de doxorrubicina leva a um dano morfológico precoce, ocorrendo antes de qualquer alteração na função cardíaca. Esses dados mostram uma grande relevância na avaliação cardíaca do paciente antes, durante e após a quimioterapia com DOX, demonstrando que a disfunção cardíaca basal só é observada quando um dano estrutural significativo já está instalado.

A caracterização da cardiotoxicidade induzida por DOX tem sido classificada como aguda e crônica (91). Atualmente, tem estado em debate essa classificação, se ela reflete duas entidades diferentes ou se simplesmente é a progressão de um diagnóstico em diferentes fases. No presente estudo e em outras pesquisas similares, sugerem que a segunda hipótese seja a mais plausível. Primeiramente, a DOX leva a um dano subclínico no miocárdio que, em seguida, progride para uma redução da FEVE e eventualmente culmina em insuficiência cardíaca (5). No entanto, nós observamos um intenso desarranjo nos cardiomiócitos logo após o término da administração de DOX, porém a disfunção contrátil só foi evidente após a segunda semana.

As alterações que observamos na ultraestrutura dos cardiomiócitos incluíram espessamento da linha Z, depósitos de glicogênio perinuclear e interfibrilar, a formação de vacúolos citoplasmáticos, distúrbio mitocondrial, e essas mudanças foram se agravando com o tempo. Mudanças estruturais maciças são características da administração de doxorrubicina (15, 92-94) e, como citamos anteriormente, apesar do grande número de estudos sobre o tema, os mecanismos ainda são obscuros e estão sob debate. Outro ponto importe foi o aumento do estresse oxidativo que parece desempenhar importante papel na gênese da cardiotoxicidade, já que demonstrou ativar vias proteolíticas, autofágicas (95) e vias apoptóticas tanto intrínsecas quanto extrínsecas (96). Os nossos achados vão de acordo com esta afirmação, já que observamos um aumento do dano oxidativo em estruturas lipídicas logo após o término da administração de doxorrubicina, provavelmente devido ao aumento na geração de ROS sem qualquer aumento compensatório na atividade de enzimas antioxidantes endógenas.

Observamos também uma redução precoce da massa cardíaca e do ventrículo esquerdo. Nossos achados estão de acordo com estudos anteriores que também mostraram uma diminuição significativa da massa cardíaca (97), diminuição da parede septal do ventrículo esquerdo (96) e do diâmetro das fibras dos cardiomiócitos (94, 97), sugerindo que a doxorrubicina induz a uma atrofia cardíaca. Em seres humanos, as estratégias não invasivas de aferição da massa ventricular esquerda são obtidas a partir da ressonância magnética cardíaca, que mostraram o índice de massa do ventrículo esquerdo está inversamente relacionado com a dose de DOX em pacientes após 88 meses do término da quimioterapia em média (98). Além disso, um menor índice de massa do ventrículo esquerdo foi associado a uma maior incidência de eventos cardíacos adversos na mesma coorte que foi acompanhada por 27 meses em média (98). Dessa forma, a medida da massa cardíaca e do ventrículo esquerdo deve ser incluída nos exames de rotina para acompanhar a “saúde” do coração após um regime quimioterápico com DOX. Nossos resultados também sugerem que a atrofia cardíaca precoce induzida pela DOX provavelmente foi conduzida por causas diferentes de apoptose, uma vez que o aumento da marcação de núcleos apoptóticos só foi observado na quarta semana após o término da administração de DOX.

Resultados semelhantes foram relatados por Zhu et al. (97), onde demonstraram que logo após o início do tratamento com DOX em camundongos jovens, foi observada uma redução da massa cardíaca, mas o aumento dos níveis de deposição de fibras de colágeno e apoptose de cardiomiócitos foram evidenciadas apenas após 13ª semana. A redução da massa cardíaca pode estar associada a um desequilíbrio no turnover proteico, levando um aumento da proteólise através da ativação do proteasoma de ubiquitina (98) e do sistema da calpaína (99), assim como aumento de processos autofágicos (100).

O dano celular inicialmente observado foi seguido de um remodelamento cardíaco, demonstrado pelo aumento de matriz extracelular e deposição de colágeno. A fibrose cardíaca ocasionada pela DOX pode ser devido ao aumento de vias proteolíticas e apoptóticas, bem como o aumento do estresse oxidativo. A geração massiva de ROS foi demonstrada por aumentar a via pro-fibrótica TGF-β/SMAD3 em ratos tratados com DOX (77, 93, 101).

Como consequência das alterações deletérias estruturais massivas observadas, a disfunção sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo ocorre, mas o comprometimento do estado basal só foi observado após quatro semanas. Apesar da

ausência de diferença estatística, nossos resultados sugerem que a DOX leva a uma diminuição da resposta adrenérgica precocemente, antes de se observar alterações basais. Observamos uma redução na resposta à uma menor concentração de norepinefrina testada em todos os animais de grupos de DOX. Em comparação com o grupo controle, os animais dos grupos DOX1 e DOX2 apresentaram redução de aproximadamente 40% na pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo (PVDE), +dP/dt e -dP/dt. Estudos demonstraram que a refração à estimulação catecolaminérgica parece ser uma característica da cardiomiopatia induzida por DOX.

Nos estágios finais da insuficiência cardíaca congestiva induzida por DOX, o suporte inotrópico com isoproterenol não foi capaz de reverter a descompensação cardíaca (102). Resultados semelhantes foram mostrados em modelos animais (103, 104), mas nenhum deles demonstrou que essa redução da reposta catecolaminérgica ocorre de início precoce. A deficiência na sinalização beta-adrenérgica parece ocorrer a nível pós-receptor. A redução da densidade do receptor beta-adrenérgico do miocárdio não é um achado consistente (103, 105), mas há um consenso de que a atividade da adenilato ciclase e a geração de AMPc são prejudicadas após administração de DOX (103-105). Esses achados nos permitem sugerir que o teste de estresse com dobutamina poderia ser usado na avaliação da função cardíaca em pacientes sob quimioterapia com DOX, uma vez que o comprometimento da resposta induzida pela catecolamina ocorre antes da disfunção cardíaca apresentar sinais clínicos.

Nossos resultados corroboram com a visão atual de que a cardiotoxicidade induzida pela DOX ocorre de forma contínua e progressiva. Onde neste contexto, o dano ocorre inicialmente a nível estrutural, mais provavelmente por causa da produção maciça de ROS, evoluindo para uma ativação de vias apoptóticas culminando em um remodelamento cardíaco. Todas estas cascatas de alterações vão culminar em um comprometimento das propriedades lusitrópicas e inotrópicas. À medida que a visão consolidada de que uma lesão cardíaca irreversível é causada pela quimioterapia com DOX vem sendo desafiada (5), o entendimento sobre a progressão das alterações morfo-funcionais causadas pela DOX pode nos permitir traçar estratégias terapêuticas profiláticas contra o desenvolvimento da toxicidade.

Portanto, o desenvolvimento de novas terapias seguras que possam prevenir os danos causados pelas drogas antitumorais é de grande importância para um melhor prognóstico. A doxorrubicina e seus derivados antracíclicos, são potentes

drogas anticâncer, que provocam danos cardíacos agudos e crônicos de forma considerável. Sabendo que o uso de dexrazoxano como agente cardioprotetor foi amplamente restrito e seu uso em crianças foi completamente desencorajado pela FDA em 2011, há uma grande necessidade de se desenvolver alternativas mais seguras. A utilização de medicamentos que já são clinicamente aprovados pode ser uma estratégia plausível em curto prazo. Dentro deste cenário, as estatinas são candidatas promissoras, pois são amplamente utilizadas para redução do perfil lipídico, na prevenção e tratamento das doenças coronarianas (106), na proteção do miocárdio no choque séptico em modelos animais (107) e no abrandamento das lesões isquêmicas causadas por isquemia e reperfusão (108).

Nesse âmbito, nosso estudo deu ênfase na utilização da rosuvastatina, uma das estatinas mais potentes, como uma ferramenta farmacológica para uso adjuvante a quimioterapia com DOX, propondo possivelmente uma estratégia terapêutica contra a cardiotoxicidade. Um estudo demonstrou uma redução do risco de desenvolvimento de ICC em pacientes que estavam em um regime quimioterápico com antraciclinas (8). Esse resultado despertou o interesse do nosso grupo em tentar entender os possíveis mecanismos que conferiram um melhor prognóstico. Alguns estudos citados anteriormente (8, 45-47) demonstram os inúmeros efeitos citoprotetores benefícios que poderiam auxiliar na prevenção da cardiotoxicidade.

Primeiramente nós não observamos uma preservação da massa cardíaca ou do volume do ventrículo esquerdo dos animais que receberam DOX concomitantemente com a ROS. Assim como citamos anteriormente, a DOX é capaz de induzir a atrofia cardíaca, que pode ser um fator associado a uma maior taxa de eventos cardíacos adversos (53, 98). De encontro com este achado, observamos certo grau de rarefação miofibrilar e retração nuclear dos cardiomiócitos. Mas apesar destes achados morfológicos de atrofia, e possivelmente ativação de vias apoptóticas, não houve aumento da deposição de fibras de colágeno no interstício tecidual cardíaco dos animais tratados com DOX e ROS.

Outro achado importante foi que a administração de rosuvastatina reduziu o quadro de estresse oxidativo, uma vez que reduziu os marcadores de danos lipídicos e proteicos, como também foi capaz de levar a um aumento da atividade das enzimas antioxidantes endógenas. Existem várias hipóteses para explicar a cardiotoxicidade induzida pela DOX, entre elas a hipótese de que ocorre uma produção excessiva de radicais livres é a que tem sido meticulosamente estudada. A DOX sofre redução de

um elétron através da ativação metabólica causada por NADPH-citocromo-P-450 redutase ou por outras enzimas que contenham flavina (109). Este processo de redução gera um radical livre semiquinona da doxorrubicina. Na presença do oxigênio molecular, a semiquinona reduz rapidamente o oxigênio a $\cdot O_2^-$ regenerando a molécula de doxorrubicina. O $\cdot O_2^-$ é rapidamente convertido em $H_2O_2$ de forma espontânea ou por ação da enzima superóxido dismutase. A semiquinona pode então reagir com o peróxido de hidrogénio, produzindo um radical hidroxila ($OH^-$) (110).

Essas espécies altamente tóxicas reativas de oxigênio interagem com muitas moléculas celulares, incluindo ácidos nucleicos, proteínas e lipídios, causando danos celulares muitas vezes irreparáveis o que pode ocasionar a ativação de vias apoptóticas e a morte celular. Muitas evidências demonstram que a DOX leva a um aumento na peroxidação lipídica e a produção de radicais livres no tecido cardíaco (96, 111, 112). O desiquilíbrio entre a produção de radicais livres e a atividade antioxidante endógena leva a um aumento de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio que culminam em dano oxidativo (113). A rosuvastatina tem demonstrado uma capacidade de atenuar o estresse oxidativo através de vários efeitos antioxidantes, como a redução da NADPH-oxidase, supressão da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) desacoplada, *up-regulation* dos mecanismos de defesa enzimática antioxidante e redução do dano causado no DNA induzido pelo peróxido de hidrogênio (114-117).

A constante exposição à ROS em que quase todas as células vivas de um organismo, levou ao desenvolvimento de um sistema de defesa antioxidante endógeno enzimático, que tem como papel, controlar a biodisponibilidade destes radicais tão importante para a homeostase, mas que também podem ser extremamente deletério. A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima que catalisa a conversão de $\cdot O_2^-$ em $H_2O_2$. Já a Catalase (CAT), uma enzima localizada nos peroxissomos, decompõe o $H_2O_2$ em água e $O_2$. A glutationa (GSH) é um tripeptídeo que atua como um importante antioxidante, que tem como papel limitar os efeitos do $H_2O_2$, sendo catalisado pela glutation-S-transferases, como também pela glutationa peroxidases (GPx), levando à formação de dissulfeto de glutationa (GSSG) a partir de duas moléculas de GSH. O GSH pode ser resintetizado através da glutationa redutase. A relação GSH/GSSG é amplamente utilizada como um marcador do estado redox (balanço entre oxidação e redução, podendo caracterizar um quadro de estresse oxidativo) celular. Outros sistemas enzimáticos com papel antioxidante

também estão presentes nas células, como as tiorretoxinas, as peroxiredoxinas e entre outras.

Já é sabido que a administração de DOX também é tóxica para a vasculatura, que acaba por prejudicar a capacidade regulatória da homeostase e perfusão tecidual (118, 119), com isso há uma grande demanda para o desenvolvimento de estratégias que possam preservar a função vascular. As estatinas têm se demonstrado um importante fármaco protetor da vasculatura, preservando e reestabelecendo a função endotelial, como também estabilizando a formação de placas ateroscleróticas. Ao investigarmos se a administração de ROS concomitante com DOX seria capaz de atenuar, preservar ou mesmo melhorar a capacidade vasodilatadora do LAM, nossos resultados demonstraram que o efeito vasodilatador dependente do endotélio promovido pela Ach foi significativamente maior no grupo DOX-ROS quando comparado com o grupo DOX. No entanto, não observamos alterações significativas na vasodilatação independente do endotélio promovida pela nitroglicerina nos grupos analisados. Além da função, também observamos uma preservação da musculatura lisa vascular, onde a estatina foi capaz que preservar as estruturas contráteis da vasculatura (α-actina de musculo liso). A melhora da função endotelial pode ser decorrente de um aumento da biodisponibilidade do óxido nítrico, o que levaria a um melhor fluxo coronariano, melhorando a perfusão de oxigênio para o miocárdico(120-122). Isso poderia explicar em parte nossos resultados em relação ao miocárdio que apesar de não termos observado uma preservação da massa cardíaca, não houve deposição de fibras de colágeno e o balanço redox foi mantido, não sendo observado então um quadro de estresse oxidativo no grupo DOX-ROS. Esses resultados reforçam a ideia de que as estatinas possuem um papel importante na cardioproteção contra a toxicidade induzida por antraciclinas.

As estatinas demonstraram exercer efeitos benéficos no endotélio vascular não só através da supressão de enzimas pro-oxidantes, mas também aumentou a atividade e a expressão dos sistemas de defesa antioxidantes endógenos, tanto em modelos experimentais quanto em estudos com humanos (123-125). Também foi demonstrado que ao aumentar os níveis de SOD, houve uma melhora da função endotelial em ratos tratados cronicamente com o inibidor de eNOS, o L-NAME (126). Além disso, os efeitos benéficos da atorvastatina na redução do tamanho da placa aterosclerótica em animais que receberam uma dieta *high-fat* são potencialmente mediados por um aumento nos níveis circulantes da enzima paraoxonase (127).

Em nosso estudo, uma melhora do estado redox, diminuição da deposição de fibras de colágeno no miocárdio e preservação da função vascular no modelo de cardiomiopatia induzida por doxorrubicina, são os possíveis mecanismos envolvidos na cardioproteção conferida pela rosuvastatina. No entanto, as evidências sobre a atividade pleiotrópica das estatinas continuam surgindo. As estatinas também demonstraram possuir uma série de outras propriedades além de hipolipemiante como de redução da massa do VE na IC, diminuição da fibrose no VE, diminuição do perfil inflamatório, da ativação imune, altera a atividade das metaloproteinas, diminui o estresse oxidativo, aumenta a complacência arterial e redução de trombose. Todos esses fatores podem contribuir de alguma forma para uma melhora da função ventricular esquerda e prevenir ou atenuar o remodelamento progressivo do VE na insuficiência cardíaca induzida por antraciclinas. Parece que há muitos mecanismos biológicos que são plausíveis para esses benefícios relacionados, onde muitos deles são independentes dos efeitos hipolipemiantes. Tais benefícios são distintos dos medicamentos cardioprotetores com aplicação clínica, sugerindo que a terapêutica utilizando as estatinas possa ter um papel singular e aditivo. Se nossa afirmação for verdadeira, essa conclusão poderá ter uma repercussão em longo prazo, onde as estatinas poderão ser terapeuticamente úteis para o tratamento da IC, mesmo em pacientes que não tenham indicação para seu uso como hipolipemiante.

## CONCLUSÃO

Nossos resultados vão de encontro com a visão atual de que a cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina ocorre de forma continua e progressiva, onde observa-se primeiramente um dano estrutural provavelmente causado pela produção excessiva de de EROs e redução da resposta cardíaca adrenérgica, que acaba por evoluir com ativação de vias apoptóticas, remodelamento cardíaco culminando com comprometimento severo das propriedade inotrópicas e lusitrópicas cardíacas. O entendimento de como se dá a progressão da cardiomiopatia induzida pela doxorrubicina e das alterações morfo-funcionais, pode nos permitir traçar estratégias para se começar um tratamento profilático adequado. Assim, a inclusão da rosuvastatina como terapia adjuvante na prevenção da cardiotoxicidade, parece ser promissora uma vez que uma redução do quadro de estresse oxidativo e preservação da função estrutura vascular são resultados importantes no combate a cardiotoxicidade.

## REFERÊNCIAS


1. Schwartz RG, Jain D, Storozynsky E. Traditional and novel methods to assess and prevent chemotherapy-related cardiac dysfunction noninvasively. Journal of nuclear cardiology: official publication of the American Society of Nuclear Cardiology. 2013 Jun;20(3):443-64. PubMed PMID: 23572315.

2. Russell RR, Alexander J, Jain D, Poornima IG, Srivastava AV, Storozynsky E, et al. The role and clinical effectiveness of multimodality imaging in the management of cardiac complications of cancer and cancer therapy. Journal of nuclear cardiology : official publication of the American Society of Nuclear Cardiology. 2016 Aug;23(4):856-84. PubMed PMID: 27251147.

3. Volkova M, Russell R, 3rd. Anthracycline cardiotoxicity: prevalence, pathogenesis and treatment. Current cardiology reviews. 2011 Nov;7(4):214-20. PubMed PMID: 22758622. Pubmed Central PMCID: 3322439.

4. Bristow MR, Thompson PD, Martin RP, Mason JW, Billingham ME, Harrison DC. Early anthracycline cardiotoxicity. The American journal of medicine. 1978 Nov;65(5):823-32. PubMed PMID: 707541.

5. Cardinale D, Colombo A, Bacchiani G, Tedeschi I, Meroni CA, Veglia F, et al. Early detection of anthracycline cardiotoxicity and improvement with heart failure therapy. Circulation. 2015 Jun 02;131(22):1981-8. PubMed PMID: 25948538.

6. Xu X, Persson HL, Richardson DR. Molecular pharmacology of the interaction of anthracyclines with iron. Molecular pharmacology. 2005 Aug;68(2):261-71. PubMed PMID: 15883202.

7. Zhang S, Liu X, Bawa-Khalfe T, Lu LS, Lyu YL, Liu LF, et al. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. Nature medicine. 2012 Nov;18(11):1639-42. PubMed PMID: 23104132.

8. Seicean S, Seicean A, Plana JC, Budd GT, Marwick TH. Effect of statin therapy on the risk for incident heart failure in patients with breast cancer receiving anthracycline chemotherapy: an observational clinical cohort study. J Am Coll Cardiol. 2012 Dec 11;60(23):2384-90. PubMed PMID: 23141499.

9. Ewer MS, Ewer SM. Cardiotoxicity of anticancer treatments: what the cardiologist needs to know. Nat Rev Cardiol. 2010 Oct;7(10):564-75. PubMed PMID: 20842180. Epub 2010/09/16. eng.

10. Dazzi H, Kaufmann K, Follath F. Anthracycline-induced acute cardiotoxicity in adults treated for leukaemia. Analysis of the clinico-pathological aspects of documented acute anthracycline-induced cardiotoxicity in patients treated for acute leukaemia at the University Hospital of Zurich, Switzerland, between 1990 and 1996. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology. 2001 Jul;12(7):963-6. PubMed PMID: 11521803.

11. Lipshultz SE, Colan SD, Gelber RD, Perez-Atayde AR, Sallan SE, Sanders SP. Late cardiac effects of doxorubicin therapy for acute lymphoblastic leukemia in childhood. The New England journal of medicine. 1991 Mar 21;324(12):808-15. PubMed PMID: 1997853.

12. Lipshultz SE, Lipsitz SR, Sallan SE, Dalton VM, Mone SM, Gelber RD, et al. Chronic progressive cardiac dysfunction years after doxorubicin therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2005 Apr 20;23(12):2629-36. PubMed PMID: 15837978.

13. Von Hoff DD, Layard MW, Basa P, Davis HL, Jr., Von Hoff AL, Rozencweig M, et al. Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. Annals of internal medicine. 1979 Nov;91(5):710-7. PubMed PMID: 496103.

14. Panjrath GS, Patel V, Valdiviezo CI, Narula N, Narula J, Jain D. Potentiation of Doxorubicin cardiotoxicity by iron loading in a rodent model. J Am Coll Cardiol. 2007 Jun 26;49(25):2457-64. PubMed PMID: 17599610.

15. Miranda CJ, Makui H, Soares RJ, Bilodeau M, Mui J, Vali H, et al. Hfe deficiency increases susceptibility to cardiotoxicity and exacerbates changes in iron metabolism induced by doxorubicin. Blood. 2003 Oct 01;102(7):2574-80. PubMed PMID: 12805055.

16. Alexander J, Dainiak N, Berger HJ, Goldman L, Johnstone D, Reduto L, et al. Serial assessment of doxorubicin cardiotoxicity with quantitative radionuclide angiocardiography. The New England journal of medicine. 1979 Feb 08;300(6):278-83. PubMed PMID: 759880.

17. Choi BW, Berger HJ, Schwartz PE, Alexander J, Wackers FJ, Gottschalk A, et al. Serial radionuclide assessment of doxorubicin cardiotoxicity in cancer patients with abnormal baseline resting left ventricular performance. American heart journal. 1983 Oct;106(4 Pt 1):638-43. PubMed PMID: 6613807.

18. Schwartz RG, McKenzie WB, Alexander J, Sager P, D'Souza A, Manatunga A, et al. Congestive heart failure and left ventricular dysfunction complicating doxorubicin therapy. Seven-year experience using serial radionuclide angiocardiography. The American journal of medicine. 1987 Jun;82(6):1109-18. PubMed PMID: 3605130.

19. Mitani I, Jain D, Joska TM, Burtness B, Zaret BL. Doxorubicin cardiotoxicity: prevention of congestive heart failure with serial cardiac function monitoring with equilibrium radionuclide angiocardiography in the current era. Journal of nuclear cardiology : official publication of the American Society of Nuclear Cardiology. 2003 Mar-Apr;10(2):132-9. PubMed PMID: 12673177.

20. Carver JR, Shapiro CL, Ng A, Jacobs L, Schwartz C, Virgo KS, et al. American Society of Clinical Oncology clinical evidence review on the ongoing care of adult cancer survivors: cardiac and pulmonary late effects. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2007 Sep 01;25(25):3991-4008. PubMed PMID: 17577017.

21. Wojnowski L, Kulle B, Schirmer M, Schluter G, Schmidt A, Rosenberger A, et al. NAD(P)H oxidase and multidrug resistance protein genetic polymorphisms are associated with doxorubicin-induced cardiotoxicity. Circulation. 2005 Dec 13;112(24):3754-62. PubMed PMID: 16330681.

22. Seidman A, Hudis C, Pierri MK, Shak S, Paton V, Ashby M, et al. Cardiac dysfunction in the trastuzumab clinical trials experience. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2002 Mar 01;20(5):1215-21. PubMed PMID: 11870163.

23. Wells QS, Lenihan DJ. Reversibility of left ventricular dysfunction resulting from chemotherapy: can this be expected? Progress in cardiovascular diseases. 2010 Sep-Oct;53(2):140-8. PubMed PMID: 20728701.

24. Chu TF, Rupnick MA, Kerkela R, Dallabrida SM, Zurakowski D, Nguyen L, et al. Cardiotoxicity associated with tyrosine kinase inhibitor sunitinib. Lancet. 2007 Dec 15;370(9604):2011-9. PubMed PMID: 18083403. Pubmed Central PMCID: 2643085.

25. Mackey JR, Clemons M, Cote MA, Delgado D, Dent S, Paterson A, et al. Cardiac management during adjuvant trastuzumab therapy: recommendations of the Canadian Trastuzumab Working Group. Current oncology. 2008 Jan;15(1):24-35. PubMed PMID: 18317582. Pubmed Central PMCID: 2259434.

26. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE, Jr., Drazner MH, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. J Am Coll Cardiol. 2013 Oct 15;62(16):e147-239. PubMed PMID: 23747642.

27. Thavendiranathan P, Grant AD, Negishi T, Plana JC, Popovic ZB, Marwick TH. Reproducibility of echocardiographic techniques for sequential assessment of left ventricular ejection fraction and volumes: application to patients undergoing cancer chemotherapy. J Am Coll Cardiol. 2013 Jan 08;61(1):77-84. PubMed PMID: 23199515.

28. Walker J, Bhullar N, Fallah-Rad N, Lytwyn M, Golian M, Fang T, et al. Role of three-dimensional echocardiography in breast cancer: comparison with two-dimensional echocardiography, multiple-gated acquisition scans, and cardiac magnetic resonance imaging. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2010 Jul 20;28(21):3429-36. PubMed PMID: 20530277.

29. Marchandise B, Schroeder E, Bosly A, Doyen C, Weynants P, Kremer R, et al. Early detection of doxorubicin cardiotoxicity: interest of Doppler echocardiographic analysis of left ventricular filling dynamics. American heart journal. 1989 Jul;118(1):92-8. PubMed PMID: 2741800.

30. Sawaya H, Sebag IA, Plana JC, Januzzi JL, Ky B, Cohen V, et al. Early detection and prediction of cardiotoxicity in chemotherapy-treated patients. The American

journal of cardiology. 2011 May 1;107(9):1375-80. PubMed PMID: 21371685. Pubmed Central PMCID: 3703314.

31. Cardinale D, Sandri MT. Role of biomarkers in chemotherapy-induced cardiotoxicity. Progress in cardiovascular diseases. 2010 Sep-Oct;53(2):121-9. PubMed PMID: 20728699.

32. 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. American journal of clinical pathology. 2008 Nov;130(5):688-95. PubMed PMID: 18854260.

33. Fallah-Rad N, Walker JR, Wassef A, Lytwyn M, Bohonis S, Fang T, et al. The utility of cardiac biomarkers, tissue velocity and strain imaging, and cardiac magnetic resonance imaging in predicting early left ventricular dysfunction in patients with human epidermal growth factor receptor II-positive breast cancer treated with adjuvant trastuzumab therapy. J Am Coll Cardiol. 2011 May 31;57(22):2263-70. PubMed PMID: 21616287.

34. Jurcut R, Wildiers H, Ganame J, D'Hooge J, De Backer J, Denys H, et al. Strain rate imaging detects early cardiac effects of pegylated liposomal Doxorubicin as adjuvant therapy in elderly patients with breast cancer. Journal of the American Society of Echocardiography : official publication of the American Society of Echocardiography. 2008 Dec;21(12):1283-9. PubMed PMID: 19041569.

35. Lipshultz SE, Miller TL, Lipsitz SR, Neuberg DS, Dahlberg SE, Colan SD, et al. Continuous Versus Bolus Infusion of Doxorubicin in Children With ALL: Long-term Cardiac Outcomes. Pediatrics. 2012 Dec;130(6):1003-11. PubMed PMID: 23166343. Pubmed Central PMCID: 3507254.

36. Palmieri C, Misra V, Januszewski A, Yosef H, Ashford R, Keary I, et al. Multicenter experience of nonpegylated liposomal doxorubicin use in the management of metastatic breast cancer. Clinical breast cancer. 2014 Apr;14(2):85-93. PubMed PMID: 24325950.

37. Group CsO. Children's Oncology Group. Long-term Follow-Up Guidelines for Survivors of Childhood, Adolescent and Young Adult Cancers, Version 4.0. Children's Oncology Group. 2013;4.0. http://www.survivorshipguidelines.org/pdf/LTFUGuidelines_40.pdf.

38. Swain SM, Whaley FS, Gerber MC, Weisberg S, York M, Spicer D, et al. Cardioprotection with dexrazoxane for doxorubicin-containing therapy in advanced breast cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 1997 Apr;15(4):1318-32. PubMed PMID: 9193323.

39. Swain SM, Whaley FS, Gerber MC, Ewer MS, Bianchine JR, Gams RA. Delayed administration of dexrazoxane provides cardioprotection for patients with advanced breast cancer treated with doxorubicin-containing therapy. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 1997 Apr;15(4):1333-40. PubMed PMID: 9193324.

40. Shaikh F, Dupuis LL, Alexander S, Gupta A, Mertens L, Nathan PC. Cardioprotection and Second Malignant Neoplasms Associated With Dexrazoxane in Children Receiving Anthracycline Chemotherapy: A Systematic Review and Meta-Analysis. Journal of the National Cancer Institute. 2016 Apr;108(4). PubMed PMID: 26598513.

41. Armenian SH, Lacchetti C, Barac A, Carver J, Constine LS, Denduluri N, et al. Prevention and Monitoring of Cardiac Dysfunction in Survivors of Adult Cancers: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2017 Mar 10;35(8):893-911. PubMed PMID: 27918725.

42. Akpek M, Ozdogru I, Sahin O, Inanc M, Dogan A, Yazici C, et al. Protective effects of spironolactone against anthracycline-induced cardiomyopathy. European journal of heart failure. 2015 Jan;17(1):81-9. PubMed PMID: 25410653.

43. Gulati G, Heck SL, Ree AH, Hoffmann P, Schulz-Menger J, Fagerland MW, et al. Prevention of cardiac dysfunction during adjuvant breast cancer therapy (PRADA): a 2 x 2 factorial, randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial of candesartan and metoprolol. European heart journal. 2016 Jun 1;37(21):1671-80. PubMed PMID: 26903532. Pubmed Central PMCID: 4887703.

44. Bosch X, Rovira M, Sitges M, Domenech A, Ortiz-Perez JT, de Caralt TM, et al. Enalapril and carvedilol for preventing chemotherapy-induced left ventricular systolic dysfunction in patients with malignant hemopathies: the OVERCOME trial (preventiOn of left Ventricular dysfunction with Enalapril and caRvedilol in patients submitted to intensive ChemOtherapy for the treatment of Malignant hEmopathies). J Am Coll Cardiol. 2013 Jun 11;61(23):2355-62. PubMed PMID: 23583763.

45. Riad A, Bien S, Westermann D, Becher PM, Loya K, Landmesser U, et al. Pretreatment with statin attenuates the cardiotoxicity of Doxorubicin in mice. Cancer Res. 2009 Jan 15;69(2):695-9. PubMed PMID: 19147586.

46. Acar Z, Kale A, Turgut M, Demircan S, Durna K, Demir S, et al. Efficiency of atorvastatin in the protection of anthracycline-induced cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol. 2011 Aug 23;58(9):988-9. PubMed PMID: 21851890.

47. Chotenimitkhun R, D'Agostino R, Jr., Lawrence JA, Hamilton CA, Jordan JH, Vasu S, et al. Chronic statin administration may attenuate early anthracycline-associated declines in left ventricular ejection function. The Canadian journal of cardiology. 2015 Mar;31(3):302-7. PubMed PMID: 25662284. Pubmed Central PMCID: 4410009.

48. Pituskin E, Mackey JR, Koshman S, Jassal D, Pitz M, Haykowsky MJ, et al. Multidisciplinary Approach to Novel Therapies in Cardio-Oncology Research (MANTICORE 101-Breast): A Randomized Trial for the Prevention of Trastuzumab-Associated Cardiotoxicity. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2017 Mar 10;35(8):870-7. PubMed PMID: 27893331.

49. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, et al. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. The New England journal of medicine. 1996 Oct 3;335(14):1001-9. PubMed PMID: 8801446.

50. Domanski M, Tian X, Fleg J, Coady S, Gosen C, Kirby R, et al. Pleiotropic effect of lovastatin, with and without cholestyramine, in the post coronary artery bypass graft (Post CABG) trial. The American journal of cardiology. 2008 Oct 15;102(8):1023-7. PubMed PMID: 18929703.

51. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM, Jr., Kastelein JJ, et al. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. The New England journal of medicine. 2008 Nov 20;359(21):2195-207. PubMed PMID: 18997196.

52. Landmesser U, Bahlmann F, Mueller M, Spiekermann S, Kirchhoff N, Schulz S, et al. Simvastatin versus ezetimibe: pleiotropic and lipid-lowering effects on endothelial function in humans. Circulation. 2005 May 10;111(18):2356-63. PubMed PMID: 15867181.

53. Liu PY, Liu YW, Lin LJ, Chen JH, Liao JK. Evidence for statin pleiotropy in humans: differential effects of statins and ezetimibe on rho-associated coiled-coil containing protein kinase activity, endothelial function, and inflammation. Circulation. 2009 Jan 6;119(1):131-8. PubMed PMID: 19075102. Pubmed Central PMCID: 2745913.

54. Zhang L, Gong D, Li S, Zhou X. Meta-analysis of the effects of statin therapy on endothelial function in patients with diabetes mellitus. Atherosclerosis. 2012 Jul;223(1):78-85. PubMed PMID: 22326029.

55. Istvan ES, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. Science. 2001 May 11;292(5519):1160-4. PubMed PMID: 11349148.

56. Margaritis M, Channon KM, Antoniades C. Statins and vein graft failure in coronary bypass surgery. Current opinion in pharmacology. 2012 Apr;12(2):172-80. PubMed PMID: 22326889. Pubmed Central PMCID: 3378631.

57. Antonopoulos AS, Margaritis M, Shirodaria C, Antoniades C. Translating the effects of statins: from redox regulation to suppression of vascular wall inflammation. Thrombosis and haemostasis. 2012 Nov;108(5):840-8. PubMed PMID: 22872079.

58. Sorrentino S, Landmesser U. Nonlipid-lowering effects of statins. Current treatment options in cardiovascular medicine. 2005 Dec;7(6):459-66. PubMed PMID: 16283973.

59. Kosmidou I, Moore JP, Weber M, Searles CD. Statin treatment and 3' polyadenylation of eNOS mRNA. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2007 Dec;27(12):2642-9. PubMed PMID: 17916773.

60. Cafforio P, Dammacco F, Gernone A, Silvestris F. Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells. Carcinogenesis. 2005 May;26(5):883-91. PubMed PMID: 15705602.

61. Agarwal B, Bhendwal S, Halmos B, Moss SF, Ramey WG, Holt PR. Lovastatin augments apoptosis induced by chemotherapeutic agents in colon cancer cells. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 1999 Aug;5(8):2223-9. PubMed PMID: 10473109.

62. Rao S, Lowe M, Herliczek TW, Keyomarsi K. Lovastatin mediated G1 arrest in normal and tumor breast cells is through inhibition of CDK2 activity and redistribution of p21 and p27, independent of p53. Oncogene. 1998 Nov 5;17(18):2393-402. PubMed PMID: 9811471.

63. Fritz G. Targeting the mevalonate pathway for improved anticancer therapy. Current cancer drug targets. 2009 Aug;9(5):626-38. PubMed PMID: 19508172.

64. Feleszko W, Mlynarczuk I, Olszewska D, Jalili A, Grzela T, Lasek W, et al. Lovastatin potentiates antitumor activity of doxorubicin in murine melanoma via an apoptosis-dependent mechanism. International journal of cancer. 2002 Jul 1;100(1):111-8. PubMed PMID: 12115596.

65. Feleszko W, Jakobisiak M. Lovastatin augments apoptosis induced by chemotherapeutic agents in colon cancer cells. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2000 Mar;6(3):1198-9. PubMed PMID: 10741752.

66. Dimitroulakos J, Nohynek D, Backway KL, Hedley DW, Yeger H, Freedman MH, et al. Increased sensitivity of acute myeloid leukemias to lovastatin-induced apoptosis: A potential therapeutic approach. Blood. 1999 Feb 15;93(4):1308-18. PubMed PMID: 9949174.

67. Dimitroulakos J, Ye LY, Benzaquen M, Moore MJ, Kamel-Reid S, Freedman MH, et al. Differential sensitivity of various pediatric cancers and squamous cell carcinomas to lovastatin-induced apoptosis: therapeutic implications. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2001 Jan;7(1):158-67. PubMed PMID: 11205904.

68. Damrot J, Nubel T, Epe B, Roos WP, Kaina B, Fritz G. Lovastatin protects human endothelial cells from the genotoxic and cytotoxic effects of the anticancer drugs doxorubicin and etoposide. British journal of pharmacology. 2006 Dec;149(8):988-97. PubMed PMID: 17088865. Pubmed Central PMCID: 2014634.

69. Mahmoudi M, Gorenne I, Mercer J, Figg N, Littlewood T, Bennett M. Statins use a novel Nijmegen breakage syndrome-1-dependent pathway to accelerate DNA repair in vascular smooth muscle cells. Circulation research. 2008 Sep 26;103(7):717-25. PubMed PMID: 18723444.

70. Haydont V, Bourgier C, Pocard M, Lusinchi A, Aigueperse J, Mathe D, et al. Pravastatin Inhibits the Rho/CCN2/extracellular matrix cascade in human fibrosis explants and improves radiation-induced intestinal fibrosis in rats. Clinical cancer

research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2007 Sep 15;13(18 Pt 1):5331-40. PubMed PMID: 17875761.

71. Haydont V, Bourgier C, Vozenin-Brotons MC. Rho/ROCK pathway as a molecular target for modulation of intestinal radiation-induced toxicity. The British journal of radiology. 2007 Sep;80 Spec No 1:S32-40. PubMed PMID: 17704324.

72. Huelsenbeck J, Henninger C, Schad A, Lackner KJ, Kaina B, Fritz G. Inhibition of Rac1 signaling by lovastatin protects against anthracycline-induced cardiac toxicity. Cell Death Dis. 2011 Aug 11;2:e190. PubMed PMID: 21833028. Pubmed Central PMCID: 3181415.

73. Yoshida M, Shiojima I, Ikeda H, Komuro I. Chronic doxorubicin cardiotoxicity is mediated by oxidative DNA damage-ATM-p53-apoptosis pathway and attenuated by pitavastatin through the inhibition of Rac1 activity. Journal of molecular and cellular cardiology. 2009 Nov;47(5):698-705. PubMed PMID: 19660469.

74. Henninger C, Huelsenbeck J, Huelsenbeck S, Grosch S, Schad A, Lackner KJ, et al. The lipid lowering drug lovastatin protects against doxorubicin-induced hepatotoxicity. Toxicology and applied pharmacology. 2012 May 15;261(1):66-73. PubMed PMID: 22712078.

75. Rashid M, Tawara S, Fukumoto Y, Seto M, Yano K, Shimokawa H. Importance of Rac1 signaling pathway inhibition in the pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors. Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society. 2009 Feb;73(2):361-70. PubMed PMID: 19060417.

76. Ma J, Wang Y, Zheng D, Wei M, Xu H, Peng T. Rac1 signalling mediates doxorubicin-induced cardiotoxicity through both reactive oxygen species-dependent and -independent pathways. Cardiovascular research. 2013 Jan 1;97(1):77-87. PubMed PMID: 23027656.

77. Huelsenbeck SC, Schorr A, Roos WP, Huelsenbeck J, Henninger C, Kaina B, et al. Rac1 protein signaling is required for DNA damage response stimulated by topoisomerase II poisons. J Biol Chem. 2012 Nov 9;287(46):38590-9. PubMed PMID: 23012366. Pubmed Central PMCID: 3493904.

78. Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. Biochemical pharmacology. 1999 Apr 1;57(7):727-41. PubMed PMID: 10075079.

79. Carvalho FS, Burgeiro A, Garcia R, Moreno AJ, Carvalho RA, Oliveira PJ. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: from bioenergetic failure and cell death to cardiomyopathy. Medicinal research reviews. 2014 Jan;34(1):106-35. PubMed PMID: 23494977.

80. De Beer EL, Bottone AE, Voest EE. Doxorubicin and mechanical performance of cardiac trabeculae after acute and chronic treatment: a review. European journal of pharmacology. 2001 Mar 9;415(1):1-11. PubMed PMID: 11245845.

81. Margaritis M, Channon K, Antoniades C. Statins as regulators of redox state in the vascular endothelium: Beyond lipid lowering. Antioxid Redox Signal. 2013 Oct 10. PubMed PMID: 24111702. Epub 2013/10/12. Eng.

82. Makabe S, Takahashi Y, Watanabe H, Murakami M, Ohba T, Ito H. Fluvastatin protects vascular smooth muscle cells against oxidative stress through the Nrf2-dependent antioxidant pathway. Atherosclerosis. 2010 Dec;213(2):377-84. PubMed PMID: 20864107. Epub 2010/09/25. eng.

83. Uruno A, Motohashi H. The Keap1-Nrf2 system as an in vivo sensor for electrophiles. Nitric Oxide. 2011 Aug 1;25(2):153-60. PubMed PMID: 21385624. Epub 2011/03/10. eng.

84. Angermuller S, Fahimi HD. Imidazole-buffered osmium tetroxide: an excellent stain for visualization of lipids in transmission electron microscopy. The Histochemical journal. 1982 Sep;14(5):823-35. PubMed PMID: 6182131.

85. Resende AC, Ballejo G, Salgado MC. Role of non-nitric oxide non-prostaglandin endothelium-derived relaxing factor(s) in bradykinin vasodilation. Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas. 1998 Sep;31(9):1229-35. PubMed PMID: 9876291.

86. Draper HH, Squires EJ, Mahmoodi H, Wu J, Agarwal S, Hadley M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. Free radical biology & medicine. 1993 Oct;15(4):353-63. PubMed PMID: 8225017.

87. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods in enzymology. 1990;186:464-78. PubMed PMID: 1978225.

88. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. European journal of biochemistry. 1974 Sep 16;47(3):469-74. PubMed PMID: 4215654.

89. Aebi H. Catalase in vitro. Methods in enzymology. 1984;105:121-6. PubMed PMID: 6727660.

90. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. The Journal of laboratory and clinical medicine. 1967 Jul;70(1):158-69. PubMed PMID: 6066618.

91. Zamorano JL, Lancellotti P, Rodriguez Munoz D, Aboyans V, Asteggiano R, Galderisi M, et al. 2016 ESC Position Paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of the ESC Committee for Practice Guidelines: The Task Force for cancer treatments and cardiovascular toxicity of the European Society of Cardiology (ESC). European heart journal. 2016 Sep 21;37(36):2768-801. PubMed PMID: 27567406.

92. Chatterjee K, Zhang J, Honbo N, Karliner JS. Doxorubicin cardiomyopathy. Cardiology. 2010;115(2):155-62. PubMed PMID: 20016174. Pubmed Central PMCID: 2848530. Epub 2009/12/18. eng.

93. Henninger C, Huelsenbeck S, Wenzel P, Brand M, Huelsenbeck J, Schad A, et al. Chronic heart damage following doxorubicin treatment is alleviated by lovastatin. Pharmacological research. 2015 Jan;91:47-56. PubMed PMID: 25462173.

94. Nepomnyashchikh LM, Lushnikova EL, Molodykh NA, Klinnikova MG, Molodykh OP. Ultrastructure and stereology of cardiomyocytes in the development of regenerative and plastic myocardial insufficiency during ontogeny. Bulletin of experimental biology and medicine. 2011 May;151(1):88-94. PubMed PMID: 22442810.

95. Bartlett JJ, Trivedi PC, Pulinilkunnil T. Autophagic dysregulation in doxorubicin cardiomyopathy. Journal of molecular and cellular cardiology. 2017 Mar;104:1-8. PubMed PMID: 28108310.

96. Angsutararux P, Luanpitpong S, Issaragrisil S. Chemotherapy-Induced Cardiotoxicity: Overview of the Roles of Oxidative Stress. Oxidative medicine and cellular longevity. 2015;2015:795602. PubMed PMID: 26491536. Pubmed Central PMCID: 4602327.

97. Zhu W, Shou W, Payne RM, Caldwell R, Field LJ. A mouse model for juvenile doxorubicin-induced cardiac dysfunction. Pediatric research. 2008 Nov;64(5):488-94. PubMed PMID: 18614963. Pubmed Central PMCID: 2801890.

98. Liu J, Zheng H, Tang M, Ryu YC, Wang X. A therapeutic dose of doxorubicin activates ubiquitin-proteasome system-mediated proteolysis by acting on both the ubiquitination apparatus and proteasome. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2008 Dec;295(6):H2541-50. PubMed PMID: 18978187. Pubmed Central PMCID: 2654028.

99. Min K, Kwon OS, Smuder AJ, Wiggs MP, Sollanek KJ, Christou DD, et al. Increased mitochondrial emission of reactive oxygen species and calpain activation are required for doxorubicin-induced cardiac and skeletal muscle myopathy. The Journal of physiology. 2015 Apr 15;593(8):2017-36. PubMed PMID: 25643692. Pubmed Central PMCID: 4405757.

100. Vejpongsa P, Yeh ET. Topoisomerase 2beta: a promising molecular target for primary prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity. Clinical pharmacology and therapeutics. 2014 Jan;95(1):45-52. PubMed PMID: 24091715.

101. Cappetta D, Esposito G, Piegari E, Russo R, Ciuffreda LP, Rivellino A, et al. SIRT1 activation attenuates diastolic dysfunction by reducing cardiac fibrosis in a model of anthracycline cardiomyopathy. International journal of cardiology. 2016 Feb 15;205:99-110. PubMed PMID: 26730840.

102. Lefrak EA, Pitha J, Rosenheim S, Gottlieb JA. A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. Cancer. 1973 Aug;32(2):302-14. PubMed PMID: 4353012.

103. Calderone A, de Champlain J, Rouleau JL. Adriamycin-induced changes to the myocardial beta-adrenergic system in the rabbit. Journal of molecular and cellular cardiology. 1991 Mar;23(3):333-42. PubMed PMID: 1652646.

104. Tong J, Ganguly PK, Singal PK. Myocardial adrenergic changes at two stages of heart failure due to adriamycin treatment in rats. The American journal of physiology. 1991 Mar;260(3 Pt 2):H909-16. PubMed PMID: 2000986.

105. Nagami K, Yoshikawa T, Suzuki M, Wainai Y, Anzai T, Handa S. Abnormal beta-adrenergic transmembrane signaling in rabbits with adriamycin-induced cardiomyopathy. Japanese circulation journal. 1997 Mar;61(3):249-55. PubMed PMID: 9152774.

106. Maron DJ, Fazio S, Linton MF. Current perspectives on statins. Circulation. 2000 Jan 18;101(2):207-13. PubMed PMID: 10637210.

107. Merx MW, Liehn EA, Janssens U, Lutticken R, Schrader J, Hanrath P, et al. HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin profoundly improves survival in a murine model of sepsis. Circulation. 2004 Jun 1;109(21):2560-5. PubMed PMID: 15123521.

108. Ludman A, Venugopal V, Yellon DM, Hausenloy DJ. Statins and cardioprotection--more than just lipid lowering? Pharmacology & therapeutics. 2009 Apr;122(1):30-43. PubMed PMID: 19318042.

109. Bachur NR, Gordon SL, Gee MV. A general mechanism for microsomal activation of quinone anticancer agents to free radicals. Cancer Res. 1978 Jun;38(6):1745-50. PubMed PMID: 25710.

110. Kalyanaraman B, Sealy RC, Sivarajah K. An electron spin resonance study of o-semiquinones formed during the enzymatic and autoxidation of catechol estrogens. J Biol Chem. 1984 Nov 25;259(22):14018-22. PubMed PMID: 6094535.

111. Olson RD, Boerth RC, Gerber JG, Nies AS. Mechanism of adriamycin cardiotoxicity: evidence for oxidative stress. Life sciences. 1981 Oct 5;29(14):1393-401. PubMed PMID: 7029182.

112. Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, Janssens S, Crijns HJ, Moens AL. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. Journal of molecular and cellular cardiology. 2012 Jun;52(6):1213-25. PubMed PMID: 22465037.

113. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacognosy reviews. 2010 Jul;4(8):118-26. PubMed PMID: 22228951. Pubmed Central PMCID: 3249911.

114. Laufs U, Gertz K, Dirnagl U, Bohm M, Nickenig G, Endres M. Rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, upregulates endothelial nitric oxide synthase and protects from ischemic stroke in mice. Brain research. 2002 Jun 28;942(1-2):23-30. PubMed PMID: 12031849.

115. Habibi J, Whaley-Connell A, Qazi MA, Hayden MR, Cooper SA, Tramontano A, et al. Rosuvastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor, decreases cardiac oxidative stress and remodeling in Ren2 transgenic rats. Endocrinology. 2007 May;148(5):2181-8. PubMed PMID: 17317778.

116. Grosser N, Erdmann K, Hemmerle A, Berndt G, Hinkelmann U, Smith G, et al. Rosuvastatin upregulates the antioxidant defense protein heme oxygenase-1. Biochemical and biophysical research communications. 2004 Dec 17;325(3):871-6. PubMed PMID: 15541371.

117. Schupp N, Schmid U, Heidland A, Stopper H. Rosuvastatin protects against oxidative stress and DNA damage in vitro via upregulation of glutathione synthesis. Atherosclerosis. 2008 Aug;199(2):278-87. PubMed PMID: 18154958.

118. Cardinale D, Colombo A, Sandri MT, Lamantia G, Colombo N, Civelli M, et al. Prevention of high-dose chemotherapy-induced cardiotoxicity in high-risk patients by angiotensin-converting enzyme inhibition. Circulation. 2006 Dec 5;114(23):2474-81. PubMed PMID: 17101852.

119. Menna P, Paz OG, Chello M, Covino E, Salvatorelli E, Minotti G. Anthracycline cardiotoxicity. Expert opinion on drug safety. 2012 May;11 Suppl 1:S21-36. PubMed PMID: 21635149.

120. Fischer D, Rossa S, Landmesser U, Spiekermann S, Engberding N, Hornig B, et al. Endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure is independently associated with increased incidence of hospitalization, cardiac transplantation, or death. European heart journal. 2005 Jan;26(1):65-9. PubMed PMID: 15615801.

121. Landmesser U, Engberding N, Bahlmann FH, Schaefer A, Wiencke A, Heineke A, et al. Statin-induced improvement of endothelial progenitor cell mobilization, myocardial neovascularization, left ventricular function, and survival after experimental myocardial infarction requires endothelial nitric oxide synthase. Circulation. 2004 Oct 5;110(14):1933-9. PubMed PMID: 15466656.

122. Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? Circulation. 2004 Jun 1;109(21 Suppl 1):II27-33. PubMed PMID: 15173060.

123. Sun HX, Zeng DY, Li RT, Pang RP, Yang H, Hu YL, et al. Essential role of microRNA-155 in regulating endothelium-dependent vasorelaxation by targeting endothelial nitric oxide synthase. Hypertension. 2012 Dec;60(6):1407-14. PubMed PMID: 23108656.

124. Mitani H, Egashira K, Ohashi N, Yoshikawa M, Niwa S, Nonomura K, et al. Preservation of endothelial function by the HMG-CoA reductase inhibitor fluvastatin through its lipid-lowering independent antioxidant properties in

atherosclerotic rabbits. Pharmacology. 2003 Jul;68(3):121-30. PubMed PMID: 12784083.

125. Tawfik HE, El-Remessy AB, Matragoon S, Ma G, Caldwell RB, Caldwell RW. Simvastatin improves diabetes-induced coronary endothelial dysfunction. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 2006 Oct;319(1):386-95. PubMed PMID: 16849625.

126. Perez-Guerrero C, Alvarez de Sotomayor M, Jimenez L, Herrera MD, Marhuenda E. Effects of simvastatin on endothelial function after chronic inhibition of nitric oxide synthase by L-NAME. Journal of cardiovascular pharmacology. 2003 Aug;42(2):204-10. PubMed PMID: 12883323.

127. Sezer ED, Sozmen EY, Nart D, Onat T. Effect of atorvastatin therapy on oxidant-antioxidant status and atherosclerotic plaque formation. Vascular health and risk management. 2011;7:333-43. PubMed PMID: 21731885. Pubmed Central PMCID: 3119591.