



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Cláudia de Moraes Sequeira

**O exercício físico na insuficiência cardíaca secundária à quimioterapia
baseada em antraciclina**

Rio de Janeiro

2021

Cláudia de Morais Sequeira

**O exercício físico na insuficiência cardíaca secundária à quimioterapia baseada em
antraciclinas**

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

Orientadora: Prof^ª. Dra. Cristiane Matsuura

Rio de Janeiro

2021

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

S479 Sequeira, Cláudia de Moraes.
O exercício físico na insuficiência cardíaca secundária à quimioterapia baseada em antraciclina / Cláudia de Moraes Sequeira – 2021.
76 f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Cristiane Matsuura

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

1. Exercícios físicos - Teses. 2. Insuficiência cardíaca - Teses. 3. Doxorrubicina - Teses. 4. Antraciclina. 5. Agentes antineoplásicos - Teses. I. Matsuura, Cristiane. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.12-008.315

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

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

Assinatura

Data

Cláudia de Morais Sequeira

**O exercício físico na insuficiência cardíaca secundária à quimioterapia baseada em
antraciclinas**

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

Aprovada em 16 de dezembro de 2021.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Cristiane Matsuura
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. André Rodrigues da Cunha Barreto Vianna
Universidade Federal do Paraná

Prof^ª. Dra. Cristiane Aguiar da Costa
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof^ª. Dra. Elite Dalla Corte Frantz
Universidade Federal Fluminense

Prof^ª. Dra. Marcela Anjos Martins
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Rio de Janeiro

2021

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus filhos **Davi** e **Ester** pelo amor diário,
sem vocês eu não chegaria à conclusão desta tese.

AGRADECIMENTOS

Não imagino esta tese finalizada sem ter ajuda de pessoas tão especiais.

Início o meu agradecimento aos meus filhos Davi e Ester, sem vocês minha vida não teria propósito, como sempre digo: “Vocês são a razão do meu viver”.

Não planejava estar aqui durante a graduação e por este motivo não posso deixar de agradecer à Ive Machareth Sab, grande amiga que me apresentou a UERJ. Dentro da Universidade fui bem acolhida por todos os colegas de laboratório: Marcia, Wandinha, Dani, Iara, Daniel, Monique e atualmente como professoras: Marcelinha, Mari e Moss. Tenho muito orgulho de ter conhecido, de ter trabalhado com vocês, que se tornaram amigos na vida pessoal. Tive o privilégio de trabalhar com a querida Tati e o professor Antônio Cláudio, os fundadores do laboratório.

Jefferson e Rê muito obrigada pelo dia-dia de trabalho, com muitas risadas, tornando mais leve a nossa exaustiva rotina de alunos de pós-graduação. Não tenho palavras para agradecer o que fizeram por mim, sou muito privilegiada por tê-los como amigos.

Agradeço à minha querida orientadora Cristiane Matsuura, que me orientou no mestrado e doutorado. Você foi e é a principal responsável pela minha formação profissional. Obrigada pela confiança, pelos ensinamentos e principalmente pela compreensão. Cris, você é um exemplo de humildade, competência e sem a sua ajuda, este trabalho não existiria.

Aprendemos a trabalhar em grupo, e como é importante ter colegas de trabalho de outros laboratórios e departamentos. Então, não poderia deixar de agradecer aos meus queridos amigos e colegas: Paulinha, Andrews, Grazi, Ricardinho, Paulinho, Everton, Cris Aguiar, Day, Iza e claro as chefes dos laboratórios: Professora Penha e Ângela por sempre me acolher.

Aos técnicos, em especial à Talita que virou uma querida amiga, ao técnico Victor, por sua constante ajuda e à querida Lenize. Muito Obrigada!

À Mari, chefe do biotério, e aos bioteristas Silvia e Márcio, muito obrigada por toda ajuda.

Agradecimento Especial

A vida é uma caixinha de surpresas e às vezes é muito difícil, ainda mais numa Pandemia. O meu agradecimento especial será dedicado à minha família, principalmente aos

meus sobrinhos: Naná, Alice, Banjinho e ao Raphael que também é o meu afilhado. Aos meus irmãos: Vinicius, Flávio, Fernanda e André. Saber que vocês estão ao meu lado me deixou mais forte para enfrentar as dificuldades da vida. Obrigada aos meus pais, Mariluce e José Joaquim por todo apoio. Agradeço a querida Dalvinha que faz parte da família do coração, por ter cuidado dos meus filhos na minha constante ausência.

Aos meus filhos de quatro patas: Óvili, Scooba, Arya e Pretinha, por me fazerem sorrir até mesmo nos momentos tristes.

Ao grande amor da minha vida, Marlon, que nos meus momentos mais difíceis, esteve ao meu lado. Nossa família me mostrou como o amor é importante para superar esta difícil, porém, gratificante etapa. Amo vocês!!

Na história da humanidade (e dos animais também) aqueles que aprenderam a colaborar e improvisar foram os que prevaleceram.

Charles Darwin

RESUMO

SEQUEIRA, Cláudia de Moraes. *O exercício físico na insuficiência cardíaca secundária à quimioterapia baseada em antraciclinas*. 2021. 76 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Diversos estudos pré-clínicos demonstram que o exercício aeróbio reduz a toxicidade cardíaca induzida por doxorubicina (Dox). No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos do treinamento resistido (TR) sobre as alterações cardiovasculares causadas pela Dox, um tipo de treinamento que é recomendado em um programa de reabilitação em pacientes com câncer dada a sua eficácia em manter a massa e força muscular, podendo contribuir para a manutenção da qualidade de vida do paciente. O objetivo do estudo foi investigar os efeitos do TR sobre a morfofuncionalidade cardíaca e reatividade vascular em um modelo experimental de toxicidade induzida por Dox. Ratos Sprague Dawley adultos foram distribuídos em três grupos: (1) Controle; (2) Dox + sedentário (Dox+Sed); (3) Dox + TR. O TR foi realizado 5x/sem, por 8 sem, e consistiu na escalada em escada vertical de 54 degraus. A Dox foi administrada por 10 dias consecutivos (1 mg/kg/dia, i.p., dose total 10 mg/kg). A sobrevida, massa corporal, teste de força e função cardíaca foram mensurados ao longo do protocolo experimental. Após a eutanásia o leito arterial mesentérico dos animais foi removido e isolado para estudo da reatividade vascular. Fragmentos do VE foram utilizados para analisar a morfologia, ultraestrutura dos cardiomiócitos, estresse oxidativo, expressão proteica das vias de síntese e proliferação. A expressão proteica do homogenato da aorta foi usada para análise da sinalização adrenérgica, estresse oxidativo e remodelamento vascular. O TR promoveu a recuperação da massa corporal inicial (não observado no grupo Dox+Sed); aumento da força muscular; atenuação da diminuição da fração de ejeção ventricular; preservação da morfologia e redução de fibrose cardíaca; aumentou a atividade da enzima antioxidante GPx, além da maior sobrevida. No aspecto vascular houve conservação da resposta vasodilatadora endotélio-dependente. Portanto, o TR pode ser utilizado como uma ferramenta útil na atenuação dos efeitos adversos da Dox no tratamento quimioterápico.

Palavras-chave: Exercício resistido. Doxorubicina. Reatividade vascular. Função cardíaca.

ABSTRACT

SEQUEIRA, Cláudia de Morais. *Resistance training in heart failure secondary to anthracycline-based chemotherapy*. 2021. 76 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Several preclinical studies demonstrate that aerobic exercise reduces cardiac toxicity induced by doxorubicin (Dox). However, little is known about the effects of resistance training (RT) on the cardiovascular changes induced by Dox, a type of training that is recommended to be included in a rehabilitation program for cancer patients given its effectiveness in maintaining muscle mass and strength, and may contribute to maintenance of the patient's quality of life. The aim of the study was to investigate the effects of TR on cardiac morphofunctionality and vascular reactivity in an experimental model of Dox-induced toxicity. Adult Sprague Dawley rats were divided into three groups: (1) Control; (2) Dox + sedentary (Dox+Sed); (3) Dox + TR. The RT was performed 5x/week, for 8 weeks, and consisted of climbing a 54-step vertical ladder. Dox was administered for 10 consecutive days (1 mg/kg/day, i.p., total dose 10 mg/kg). Survival, body mass, strength test and cardiac function were measured throughout the experimental protocol. After euthanasia, the animals' mesenteric arterial bed was removed and isolated to study vascular reactivity. Fragments of the left ventricle were used to analyze the morphology, ultrastructure of cardiomyocytes, oxidative stress, protein expression of the synthesis and proliferation pathways. Protein expression of the aortic artery homogenate was used to analyze adrenergic signaling, oxidative stress and vascular remodeling. The TR promoted the recovery of the initial body mass (not observed in the Dox+Sed group); increased muscle strength; attenuation of the decrease in ventricular ejection fraction; preservation of morphology and reduction of cardiac fibrosis; increased the activity of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase, in addition to greater survival. In the vascular aspect, there was conservation of the endothelium-dependent vasodilator response. Therefore, RT can be used as a useful tool to mitigate the adverse effects of doxorubicin in chemotherapy treatment.

Keywords: Resistance exercise. Doxorubicin. Vascular reactivity. Cardiac function.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Representação gráfica de possíveis efeitos tóxicos vasculares causados por quimioterápicos.....	25
Figura 2 –	Possíveis mecanismos cardioprotetores do treinamento resistido na cardiomiopatia induzida por doxorubicina.....	26
Figura 3 –	Representação esquemática do protocolo experimental.....	33
Figura 4 –	Escada utilizada no treinamento resistido.....	35
Figura 5 –	Leito arterial mesentérico isolado.....	42
Figura 6 –	Foto do esquema de perfusão do leito arterial mesentérico.....	43
Figura 7 –	Curva de sobrevivência.....	44
Figura 8 –	Acompanhamento da massa corporal ao longo do protocolo experimental.....	46
Figura 9 –	Acompanhamento da ingestão alimentar ao longo do protocolo experimental.....	46
Figura 10 –	Teste de carga máxima.....	47
Figura 11 –	Fotomicrografias representativas.....	49
Figura 12 –	Eletromicrografia de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo.....	52
Figura 13 –	Atividade das enzimas antioxidantes, peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas em homogenato de ventrículo esquerdo	53
Figura 14 –	Níveis da proteína Akt em homogenato de ventrículo esquerdo	54
Figura 15 –	Níveis da proteína mTOR em homogenato de ventrículo esquerdo	55
Figura 16 –	Níveis da proteína ERK 1/2 em homogenato de ventrículo esquerdo	56
Figura 17 –	Níveis de proteínas nitrosiladas em homogenato de ventrículo esquerdo .	57

Figura 18 – Respostas vasodilatadoras induzidas por acetilcolina e nitroglicerina em leito arterial mesentérico.....	58
Figura 19 – Resposta vasoconstrictora induzida por norepinefrina em leito arterial mesentérico	59
Figura 20 – Níveis da proteína eNOS total e fosforilada em homogenato de aorta	60
Figura 21– Níveis da proteína NOX2 e NOX4 em homogenato de aorta	61
Figura 22 – Níveis de proteínas nitrosiladas em homogenato de aorta	62
Figura 23 – Níveis da proteína MMP-2 e TIMP-1 em homogenato de aorta	63
Figura 24 – Níveis dos receptores 1A de vasopressina e adrenérgicos α 1 e β 2 em homogenato de aorta	64

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 –	Cardiotoxicidade e uso terapêutico das antraciclina.....	23
Tabela 1 –	Resumo dos estudos que verificaram os efeitos do exercício resistido na toxicidade induzida por doxorubicina.....	29
Tabela 2 –	Detalhes da prescrição do treinamento resistido.....	35
Tabela 3 –	Massa corporal, ingestão alimentar, massa cardíaca e massa ventricular esquerda.....	45
Tabela 4 –	Função cardíaca.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Aorta abdominal
ACh	Acetilcolina
Akt	Proteína serina/treonina quinase
ANOVA	Análise de variância
CAT	Catalase
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
Cu ²⁺	Íon cúprico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
Dox	Doxorrubicina
Dox+Sed	Grupo doxorrubicina + sedentário
Dox+TR	Grupo doxorrubicina + treinamento resistido
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
eNOS	Isoforma endotelial da óxido nítrico sintase
EPM	Erro padrão da média
ERK	Quinases extracelulares reguladas por sinal
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FC	Frequência cardíaca
Fe ²⁺	Íon ferroso
Fe ³⁺	Íon férrico
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione reduzida
HCl	Ácido clorídrico
HE	Hematoxilina e eosina
H ₂ O	Água

H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
i.p	Intraperitoneal
KCl	Cloreto de potássio
LAM	Leito arterial mesentérico
MC	Massa Corporal
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotina adenina dinucleotídeo fosfato
NE	Norepinefrina
NG	Nitroglicerina
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
OH	Hidróxido
O ₂	Oxigênio
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
PAD	Pressão arterial diastólica
RI	Resto ingestão
RM	Repetição máxima
RNA	Ácido ribonucléico
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias que reagem ao Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
TR	Treinamento resistido
VE	Ventrículo Esquerdo

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	REVISÃO DE LITERATURA	20
1.1	Doxorrubicina	20
1.1.1	<u>Cardiotoxicidade das antraciclinas</u>	23
1.1.2	<u>Toxicidade vascular induzida por doxorrubicina</u>	26
1.2	Exercício físico na toxicidade induzida por doxorrubicina	25
1.2.1	<u>Modelos experimentais de treinamento resistido</u>	26
1.2.2	<u>Treinamento resistido na toxicidade induzida por doxorrubicina</u>	28
1.3	Justificativa	30
2	OBJETIVOS	31
2.1	Objetivo geral	31
2.2	Objetivos específicos	31
3	MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1	Ética na pesquisa	32
3.2	Animais	32
3.2.1	<u>Grupos experimentais</u>	32
3.3	Administração da doxorrubicina e solução salina	33
3.4	Medida da massa corporal	34
3.5	Controle da ingestão alimentar	34
3.6	Treinamento resistido	34

3.6.1	<u>Protocolo</u>	34
3.6.2	<u>Teste de carga máxima</u>	35
3.7	Avaliação da função cardíaca	36
3.8	Eutanásia e isolamento de órgãos	36
3.9	Análises histológicas	37
3.9.1	<u>Microscopia de luz</u>	37
3.9.2	<u>Microscopia eletrônica</u>	37
3.10	Biomarcadores de estresse oxidativo	38
3.10.1	<u>Atividade da enzima catalase</u>	38
3.10.2	<u>Atividade da enzima glutathiona peroxidase</u>	38
3.10.3	<u>Peroxidação lipídica</u>	39
3.10.4	<u>Carbonilação de proteínas</u>	39
3.11	Expressão proteica por Western Blotting	40
3.12	Avaliação da reatividade vascular	41
3.12.1	<u>Isolamento do leito arterial mesentérico</u>	41
3.12.2	<u>Medida da reatividade vascular as substâncias vasoativas</u>	42
3.13	Análise dos dados	43
4	RESULTADOS	44
4.1	Sobrevida	45
4.2	Massa corporal, controle da ingestão alimentar, massa cardíaca e massa ventricular esquerda	45
4.3	Força muscular	47
4.4	Efeitos do treinamento resistido sobre a morfofuncionalidade cardíaca	

	em ratos tratados com doxorubicina	48
4.4.1	<u>Função cardíaca</u>	48
4.4.2	<u>Análise morfológica do ventrículo esquerdo</u>	48
4.4.3	<u>Análise ultraestrutural dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo</u>	50
4.5	Biomarcadores de estresse oxidativo	52
4.6	Expressão de proteínas em homogenato de ventrículo esquerdo	54
4.7	Efeitos do treinamento resistido sobre a reatividade vascular em ratos tratados com doxorubicina	57
4.7.1	<u>Respostas vasodilatadoras em leito arterial mesentérico</u>	57
4.7.2	<u>Resposta vasoconstritora à norepinefrina em leito arterial mesentérico</u>	58
4.8	Expressão de proteínas em homogenato de aorta	59
5	DISCUSSÃO	65
	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	71

INTRODUÇÃO

O câncer e as doenças cardíacas continuam sendo as principais causas de morte no Brasil e no mundo. A estimativa é de que ocorram 625 mil novos casos de câncer por ano no triênio 2020-2022 em nosso país (Saúde, 2019). Apesar das melhorias na terapêutica do câncer, evidenciada pelo aumento das taxas de sobrevida e cura da doença, quimioterápicos como a doxorubicina (Dox), tem apresentado um perfil de efeitos adversos e toxicidade extremamente graves, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade entre os sobreviventes (Varghese, Johnston *et al.* 2021). A Dox, um antibiótico antitumoral da classe das antraciclinas, é amplamente utilizada para o tratamento de diversos tipos de neoplasias. Apesar da sua eficácia, seu uso clínico é limitado pela sua toxicidade cardíaca irreversível e dose dependente, que pode resultar em insuficiência cardíaca (Rawat, Jaiswal *et al.* 2021). Há diversas hipóteses a respeito do potencial cardiotoxico, incluindo o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), inibição da topoisomerase 2 β , disfunção mitocondrial, desregulação da homeostase do cálcio ou dano ao DNA (He, Liu *et al.* 2021, Rabinovich-Nikitin, Love *et al.* 2021).

Em adição, a Dox inibe a proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) que é um mediador na via de sinalização da cinase serina / treonina (Akt), que quando ativada efetua a transdução de sinal para suas respectivas proteínas alvo regulando atividades celulares importantes, incluindo proliferação, crescimento celular, inibição da apoptose e angiogênese (Hang, Zhao *et al.* 2017, Zhang, Hu *et al.* 2020). A cardiotoxicidade também está associada à cascata de proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs), por meio da inibição da ativação de cinases reguladas por sinal extracelular (ERK). Quando ocorre o aumento da fosforilação, os danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA) induzido por quimioterápicos no tecido cardíaco são atenuados (Li, Qin *et al.* 2020). Além dos efeitos diretos sobre o miocárdio, foram relatadas alterações vasculares, visto que a Dox é administrada na circulação sistêmica, permitindo desencadear prejuízos ao endotélio (Mitra and Edwards 2016). A geração das EROs tem um papel central na disfunção endotelial induzida pela Dox, como o superóxido e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) que exercem um papel importante na fisiopatologia endotelial no qual o complexo enzimático de NADPH oxidases de múltiplas subunidades parece contribuir para o comprometimento da vasodilatação dependente do endotélio ao reduzir a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) e

atuar no desacoplamento da isoforma endotelial da óxido nítrico sintase (eNOS) (Landmesser, Dikalov *et al.* 2003, Ray and Shah 2005, Luu, Chowdhury *et al.* 2018).

Diversas estratégias farmacológicas foram investigadas para atenuar a toxicidade induzida pela Dox, mas poucas se mostraram de fato eficazes na prática clínica (McGowan, Chung *et al.* 2017). Alternativamente, o exercício físico têm se mostrado uma importante intervenção para melhorar a qualidade de vida e conferir efeitos cardioprotetores em pacientes tratados com Dox (Hall, Smuder *et al.* 2019). Em modelo experimental, o treinamento aeróbio foi capaz de reduzir a mortalidade e melhorar a função cardíaca (Matsuura, Brunini *et al.* 2010, Sequeira, Martins *et al.* 2021). Evidências indicam que o exercício atenua o dano oxidativo e, como consequência, as alterações deletérias sobre a morfologia são reduzidas (Sequeira, Martins *et al.* 2021). O exercício pode atenuar a disfunção endotelial, pois é conhecido por aumentar a produção de NO e aumentar as enzimas antioxidantes (Johnson, Parker *et al.* 2000). De modo importante, o exercício exerce seus efeitos benéficos sem afetar a eficácia antitumoral da Dox (Sturgeon *et al.*, 2014).

Cada vez mais têm sido publicados estudos demonstrando os efeitos cardioprotetores do treinamento aeróbio, contudo, menos atenção vem sendo dada ao treinamento resistido (TR) (Ghignatti, Nogueira *et al.* 2021, Naaktgeboren, Binyam *et al.* 2021). O TR vem sendo recomendado por programas de reabilitação do câncer, que resultam em melhorias na qualidade de vida e na aptidão física, principalmente o aumento da força muscular (Winters-Stone, Dobek *et al.* 2012, Schmidt, Weisser *et al.* 2015). Sabe-se que tanto o câncer como o seu tratamento podem resultar em caquexia, que é caracterizada por uma expressiva perda involuntária de massa corporal, principalmente de massa magra. A presença de caquexia é um preditor importante de desfechos negativos, pois está associada a uma menor responsividade ao tratamento, a um risco aumentado de mortalidade e à redução na qualidade de vida do paciente. Dos diversos tipos de treinamento físico existentes, o TR é o que resulta em ganho de força e hipertrofia muscular, tornando-se um componente fundamental de programas de reabilitação. Há, no entanto, uma escassez de estudos sobre o tema. Até onde sabemos, apenas dois estudos investigaram o papel do TR em modelo experimental de toxicidade induzida por Dox. O primeiro verificou os efeitos preventivos de um modelo similar ao TR antes da administração do fármaco, constatando a preservação da função cardíaca e de um dos componentes contráteis (Pfannenstiel and Hayward 2018). O segundo demonstrou que a realização de TR de intensidade leve realizado concomitantemente com a administração do fármaco resulta em melhorias no controle autonômico cardíaco, hemodinâmica e atenuação do estresse oxidativo (Feitosa, Carvalho *et al.* 2021). Assim, no presente estudo objetivaremos

ampliar o entendimento sobre os efeitos do TR sobre a estrutura e a função cardiovascular em um modelo de cardiomiopatia induzida por Dox.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Doxorrubicina

1.1.1 Cardiotoxicidade das antraciclinas

Vários mecanismos têm sido propostos para compreender a fisiopatologia da cardiotoxicidade induzida pelas antraciclinas, embora ainda sejam desconhecidas as razões pelas quais estas afetam preferencialmente os cardiomiócitos (Adao, de Keulenaer *et al.* 2013). Estudos demonstram que a disfunção ventricular relacionada às antraciclinas está associada a: 1) lesão do retículo sarcoplasmático e das mitocôndrias; 2) modificação estrutural e funcional de miofibrilas; 3) perda total ou parcial da matriz intercalada com placas de colágeno no interstício; 4) modificação do acoplamento excitação-contração e do fluxo do cálcio; 5) apoptose; 6) alterações do metabolismo do ferro; e 7) perda da capacidade de regeneração do músculo cardíaco e de células endoteliais coronarianas (Kalil Filho, Hajjar *et al.* 2011). A degradação proteica está relacionada com o aumento da degradação de miofilamentos, o qual leva a um desequilíbrio no número de proteínas do sarcômero, como a actina e a miosina, acarretando assim o processo de sarcopenia cardíaca. As antraciclinas acarretam em desequilíbrio na regulação dinâmica da função cardíaca, alterações na atividade adrenérgica e na adenilato ciclase (Adao *et al.*, 2013).

A cardiotoxicidade induzida pelos antineoplásicos é classificada de acordo com o dano celular produzido. A toxicidade cardíaca do tipo I implica em morte celular por apoptose ou necrose, classificada como irreversível. No tipo II ocorre à disfunção celular, sendo então considerada reversível. Clinicamente, a cardiotoxicidade induzida pela Dox pode ser: aguda, precoce ou tardia, de acordo com o tempo decorrido entre a administração do fármaco e o início dos sintomas de toxicidade. A toxicidade aguda é aquela que ocorre durante ou imediatamente após a infusão do fármaco, principalmente quando aplicada em velocidade rápida, e os sintomas envolvem vasodilatação, hipotensão, arritmias supraventriculares, disfunção transitória do ventrículo esquerdo (VE) e alterações eletrocardiográficas, esta geralmente é reversível e acomete 1% dos pacientes (Polegato, Minicucci *et al.* 2015). A precoce é incomum e se manifesta no primeiro ano da quimioterapia, seguida de pericardite

e/ou miocardite. Já a cardiotoxicidade tardia, obtém mais atenção e tem sido extensamente estudada, surge anos após o tratamento, em média, 7 anos após término do tratamento (Narezkina and Nasim 2019). Não existem estratégias comprovadas para identificar se a disfunção cardíaca é reversível ou progressiva; contudo, a elevação dos biomarcadores pode ser uma forma de identificar pacientes em risco de cardiotoxicidade (Zamorano, Lancellotti *et al.* 2016). A predileção para toxicidade cardíaca irá variar com os diferentes protocolos de tratamento, sendo a Dox, a antraciclina mais comumente associada à disfunção ventricular podendo ser preditivo de insuficiência cardíaca que ocorrerá de forma subaguda ou crônica (Kalil Filho *et al.*, 2011).

Apesar da sua eficácia, a Dox possui um perfil clínico limitado, por apresentar um perfil de efeitos adversos extremamente graves, sendo a cardiotoxicidade o mais importante, que pode resultar em insuficiência cardíaca (Wojtacki, Lewicka-Nowak *et al.* 2000, Kim, Cho *et al.* 2018). Mesmo com o uso de protocolos com baixas doses, o risco de desenvolver insuficiência cardíaca congestiva é dose-dependente, sendo de 5% com uma dose cumulativa de 400 mg/m²; 16%, com 500 mg/m²; 26%, com 550 mg/m²; e de até 48% com uma dose de 700 mg/m² (Swain *et al.*, 2003).

Atribui-se o dano cardíaco à produção excessiva de EROs via reações de oxirredução do fármaco no complexo I da cadeia de transporte de elétrons que, por sua vez, ativam as vias de proteólises, necrose e apoptose (Min *et al.*, 2015). A geração de EROs mediado pela Dox ocorre por duas vias: enzimática, via citocromo p450; e via não enzimática, reações da Dox que envolvem o ferro. A formação de complexos de Dox-ferro pode catalisar uma reação de Fenton, na qual os metais de transição Fe²⁺ ou Cu²⁺ reduzem o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) ao radical hidroxila altamente ativo, resultando na geração de EROs (Fe²⁺ é oxidado pelo peróxido de hidrogênio a Fe³⁺) formando uma radical hidroxila no processo (Netíková, Slušná *et al.* 2017). Para evitar a ação prejudicial das EROs as células contêm mecanismos de defesa, que incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GPx) e da catalase (CAT). A enzima SOD constitui a primeira linha de defesa antioxidante e o maior sistema de defesa do organismo por catalisar a dismutação do ânion superóxido (O₂^{•-}) em H₂O₂ e oxigênio (O₂). O H₂O₂ pode ser reduzido a água e O₂ pelas enzimas GPx e CAT, mas pode também, por meio da reação de Fenton supracitada, resultar na formação do radical hidroxila, contra o qual não há sistema enzimático de defesa. O aumento na geração de EROs e redução da atividade das enzimas antioxidantes SOD, GPx e CAT são achados constantes no coração de animais com cardiotoxicidade induzida pela Dox (Akolkar, da Silva Dias *et al.* 2017)

Outra hipótese para a toxicidade cardíaca é de que a topoisomerase 2 β seja a mediadora chave da cardiotoxicidade (Vejpongsa and Yeh 2014). A Dox inibe a topoisomerase II que é fundamental para a recombinação, transcrição e/ou replicação do DNA e existem duas isoformas: a alfa que está presente em células em proliferação e constitui, inclusive, o alvo molecular para a ação antitumoral da Dox. Por outro lado, a isoforma beta é a única presente no coração e a sua inibição suprime a transcrição de genes antioxidantes e de transporte de elétrons, levando a um aumento acentuado de EROs e biogênese mitocondrial defeituosa (Narezkina e Nasim, 2019). A terceira hipótese é recente, e envolve a desregulação de processos de autofagia por lisossomos, tornando os cardiomiócitos susceptíveis à toxicidade proteica, disfunção mitocondrial e morte celular (Bartlett, Trivedi *et al.* 2017).

A via de síntese PI3K-Akt-mTOR está constantemente desregulada quando ocorre o aumento da produção de EROs. O equilíbrio entre a síntese e degradação de proteínas é fundamental para preservar a integridade cardíaca. A produção excessiva de EROs inibe a proteína Akt, a qual é responsável pela transdução de sinal envolvido em importantes atividades biológicas, como apoptose e autofagia debilitando a função contrátil (Hang, Zhao *et al.* 2017). A desregulação da via mTOR implica em alterações metabólicas, sendo primordial no crescimento e metabolismo celular, incluindo sinais internos com a expressão de proteínas relacionadas ao crescimento celular. Proteínas quinases ativadas por mitógenos, como a ERK, também são conhecidas por contribuir no crescimento e proliferação celular. O papel da ERK na hipertrofia permanece questionável, devido a achados envolvendo a indução de hipertrofia adaptativa, bem como remodelamento patológico (Smuder, Kavazis *et al.* 2013, Gallo, Vitacolonna *et al.* 2019). O quadro 1 exibe um resumo sobre a cardiotoxicidade e uso terapêutico da Dox.

Quadro 1 - Cardiotoxicidade e uso terapêutico das antraciclinas

Mecanismos da cardiotoxicidade	Mecanismos de ação antitumoral	Doxorrubicina	
		Utilização terapêutica	Cardiotoxicidade
<p><u>Principais mecanismos:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Topoisomerase II beta; ✓ Peroxidação lipídica; ✓ Estresse oxidativo; ✓ Apoptose e necrose dos cardiomiócitos. <p>Comprometimento do DNA, RNA e proteínas, e de fatores de transcrição envolvidos na regulação de genes específicos do coração.</p> <p>Balanco negativo das proteínas sarcoméricas, nos cardiomiócitos, provocado pela diminuição da expressão proteica e pelo aumento da degradação de miofilamentos.</p> <p>Lesões no DNA e alteração da bioenergética ao nível mitocondrial.</p> <p>Desequilíbrio na regulação dinâmica da função cardíaca, com alterações na atividade adrenérgica, na adenilato ciclase e na homeostasia do cálcio.</p>	<p>A formação de um complexo de DNA pela conjugação de anéis planos com nucleotídeos inibe o DNA, o RNA e a síntese proteica. Isso desencadeia a clivagem do DNA pela topoisomerase II beta, resultando em citotoxicidade.</p> <p>Inibem a atividade da helicase impedindo a clivagem enzimática da cadeia dupla de DNA, interferindo, assim, com a sua replicação e transcrição.</p> <p>Estão envolvidas em reação de oxidação/redução através da formação de radicais livres citotóxicos.</p>	<p>Câncer:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ avançado do estômago; ✓ bexiga; ✓ mama; ✓ ovários; ✓ tireoide; <p>Doença de <i>Hodgkin</i></p> <p>Leucemia aguda</p> <p>Linfoma não-<i>Hodgkin</i></p> <p>Neuroblastoma</p> <p>Sarcoma</p> <p>Tumor de <i>Wilms</i></p>	<p><u>Aguda:</u></p> <p>Hipotensão</p> <p>Arritmia</p> <p>Tromboembolismo</p> <p><u>Precoce:</u></p> <p>Pericardite</p> <p>Miocardite</p> <p><u>Tardia:</u></p> <p>Cardiomiopatia dilatada</p> <p>Disfunção contrátil</p> <p>Insuficiência cardíaca congestiva</p>

Legenda: DNA, ácido desoxirribonucleico; RNA, ácido ribonucleico.

1.1.2 Toxicidade vascular induzida por doxorrubicina

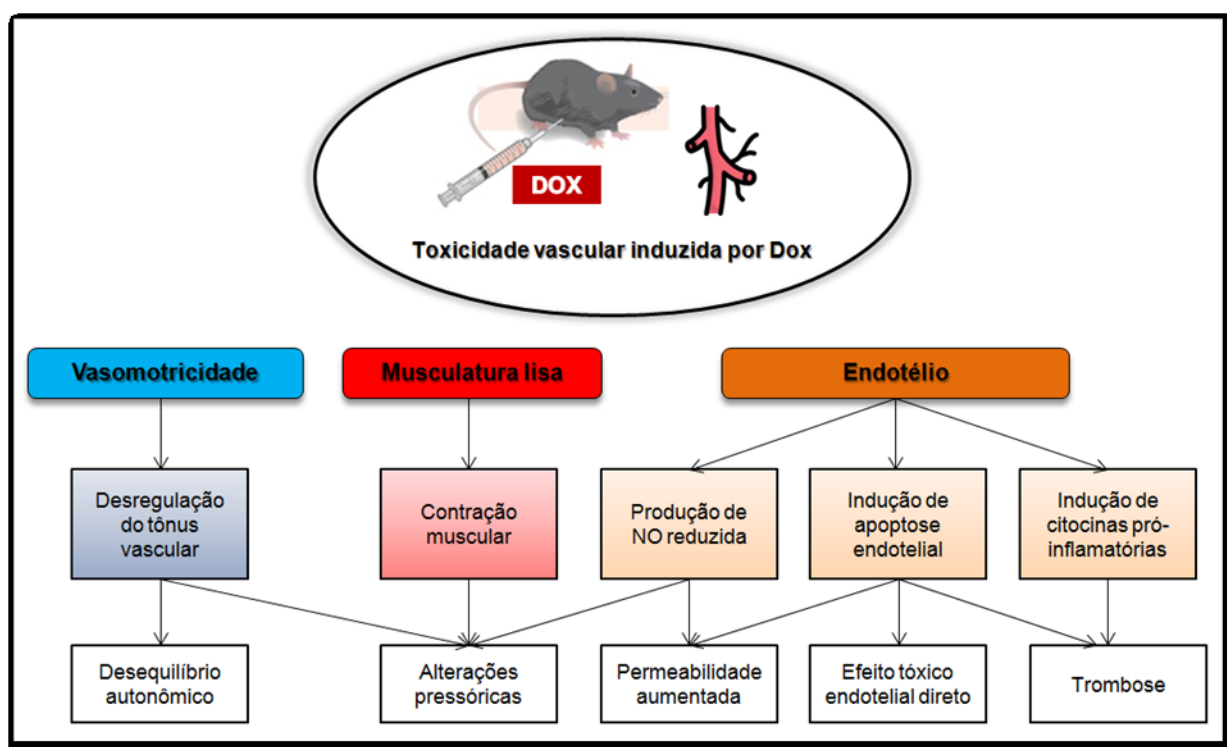
Além dos efeitos diretos sobre o músculo cardíaco, a Dox causa alterações sobre a estrutura e a função vascular promovendo modificações na hemodinâmica como: a variação no controle da pressão arterial, aumento da resistência vascular e aumento da FC (Li, Gu *et al.* 2019, Lv, Tan *et al.* 2020). Embora a toxicidade cardíaca desse fármaco seja amplamente estudada, a toxicidade vascular ainda permanece pouco compreendida. Os insultos tóxicos no endotélio contribuem para o desenvolvimento e progressão da cardiomiopatia (Luu, Chowdhury *et al.* 2018). A Dox induz a apoptose das células endoteliais vasculares, que pode estar associada a uma geração excessiva de EROs (Soultati, Mountzios *et al.* 2012). Além da já discutida produção de EROs pela redução da Dox na mitocôndria, outras fontes podem

estar envolvidas, como as enzimas NADPH oxidases (Nox), a eNOS desacoplada ou xantina oxidase. Quando hiperativadas, a Nox1 e Nox2 promovem o desenvolvimento de disfunção endotelial, hipertensão e inflamação. Já a Nox4 pode ter um papel na proteção da vasculatura durante o estresse; entretanto, quando sua atividade é aumentada, pode ser prejudicial (Konior, Schramm *et al.* 2014).

O NO produzido pelo endotélio vascular regula o fluxo sanguíneo e mantém saudável a musculatura lisa, quando ocorre a redução na liberação endotelial de NO afeta a vasodilatação, sendo associada a fatores de riscos para doenças cardiovasculares e hipertensão arterial (Mancilla, Iskra *et al.* 2019). O aumento da rigidez arterial pode dever-se a uma série de fatores, incluindo um possível remodelamento arterial ou uma disfunção endotelial que altere o equilíbrio entre os agentes vasoativos, o que pode resultar em um prejuízo na capacidade de relaxamento vascular (Luu, Chowdhury *et al.* 2018). As metaloproteinases de matriz (MMP) são uma grande família de enzimas proteolíticas que mantêm o remodelamento fisiológico e patológico de todos os tecidos. A MMP-2 é a principal metaloproteinase em tecidos cardiovasculares, incluindo aorta sendo ativada pelas EROs. A degradação das fibras elásticas na aorta devido à desregulação das MMP-2 e seu inibidor que conduz ao remodelamento patológico (Kopaliani, Martin *et al.* 2014).

Assim como no coração, existe também a hipótese que a administração de Dox possa inibir a topoisomerase 2 β , que está presente nas células endoteliais dos microvasos coronários, provocando danos direto ao DNA (Mancilla, Iskra *et al.* 2019). Além desses mecanismos, ocorre a liberação de mediadores pró-apoptóticos das células endoteliais levando à apoptose dos mesmos e do músculo liso (Scarabelli, Stephanou *et al.* 2001). Compreender a fisiopatologia da toxicidade vascular induzida pela Dox leva diretamente a um melhor diagnóstico, tratamento e prevenção em pacientes com câncer. A figura 1 ilustra os possíveis locais de dano dos agentes quimioterápicos e as possíveis consequências para a homeostase vascular.

Figura 1 - Representação gráfica de possíveis efeitos tóxicos vasculares causados por quimioterápicos



Legenda: Dox, doxorubicina; NO, óxido nítrico.
 Fonte: Adaptado de Soulati *et al.*, 2012.

1.2 Exercício físico na toxicidade induzida por doxorubicina

A quantidade de sobreviventes do câncer é cada vez maior e estima-se que deverá dobrar nas próximas décadas. Apesar de o tratamento ser cada vez mais eficaz esse grupo ainda enfrenta desafios únicos, como declínios na capacidade física, qualidade de vida e riscos aumentados de recorrência do câncer e mortalidade por todas as causas em comparação com pessoas sem câncer (Campbell, Winters-Stone *et al.* 2019). Dessa forma, diversas estratégias farmacológicas foram estudadas com intuito de atenuar a toxicidade induzida pela Dox, variando desde o uso de antioxidantes, derivados lipossomais, preparações de antraciclinas modificadas e outras classes de fármacos (i.e., beta bloqueadores, estatinas, inibidores da ECA). Apesar de muito promissores em modelo experimental, os ensaios clínicos controlados apresentaram resultados divergentes, com grande parte não tendo sido utilizado na prática clínica (McGowan, Chung *et al.* 2017). Alternativamente, o *American College of Sports Medicine* publicou, em 2010, um dos primeiros documentos relatando a eficácia e segurança

da prática de exercício físico, uma intervenção não farmacológica e não invasiva, em sobreviventes do câncer (Schmitz, Courneya *et al.* 2010). Desde então, diversas publicações vêm mostrando o papel protetor do treinamento físico na cardiotoxicidade induzida por Dox, inclusive de nosso grupo (Matsuura, Brunini *et al.* 2010, Sequeira, Martins *et al.* 2021). Os mecanismos envolvidos nessa proteção permanecem desconhecidos, mas as alterações mediadas pelo exercício na composição corporal, nos níveis hormonais, na inflamação sistêmica e na função celular imunológica vêm sendo sugeridas como os responsáveis por esse efeito terapêutico (Idorn and Thor Straten 2017). A capacidade do exercício físico de prevenir ou atenuar a toxicidade induzida por quimioterápicos é um campo emergente de pesquisa, tendo apresentado resultados promissores em diversos estudos pré-clínicos (Chen, Wu *et al.* 2017). Recentemente, uma revisão sistemática com meta-análise demonstrou que diversas intervenções com exercício são capazes de proteger contra a cardiotoxicidade induzida pela Dox em roedores, sendo a diminuição do acúmulo de Dox no miocárdio como um dos possíveis mecanismos (Naaktgeboren, Binyam *et al.* 2021). Mas, é importante ressaltar que isso ocorre sem prejuízo da eficácia antitumoral. Um outro aspecto a ser salientado é que quase todos os estudos utilizaram o treinamento aeróbio como forma de treinamento. Sabe-se que a melhoria da aptidão física se baseia em um tripé que envolve a resistência aeróbia, a força e a flexibilidade. Assim, torna-se imperativo conhecer os efeitos de outros tipos de exercício sobre o manejo dos efeitos adversos decorrentes do tratamento quimioterápico.

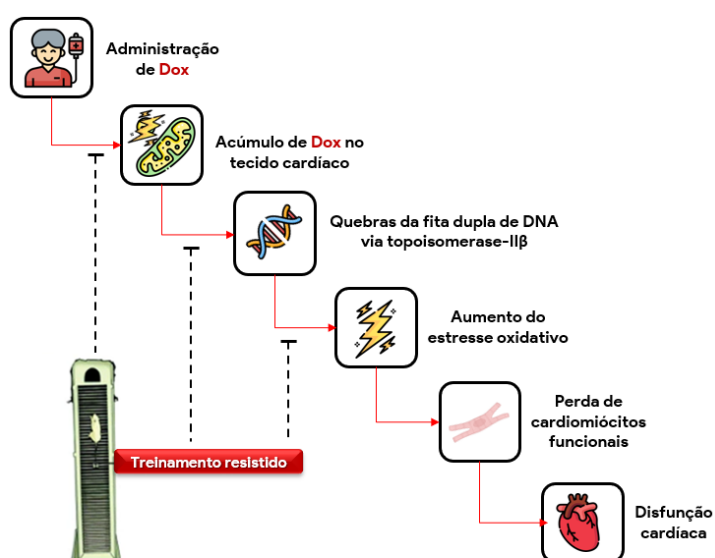
1.2.1 Modelos experimentais de treinamento resistido

Os modelos experimentais de exercício em roedores foram desenvolvidos com o intuito de simular as atividades físicas em humanos, particularmente visando compreender os mecanismos fisiológicos do exercício e determinar seus efeitos na saúde e doença (Seo, Lee *et al.* 2014). Os modelos de TR são utilizados para aumentar a força, potência e/ou resistência muscular e, com isso, atenuar a atrofia e/ou aumentar a aptidão física. As adaptações ao mesmo dependem da manipulação de suas variáveis, sendo as principais: intensidade, número de séries e repetições e intervalo de recuperação entre séries. A realização do TR em roedores é um desafio, visto que uma parte dos animais não realizam facilmente o exercício de forma voluntária. Desse modo, equipamentos projetados especificamente com essa finalidade e

estímulos de exercício (i.e., choque elétrico) são utilizados para provocar os animais a realizar o exercício. Os modelos de TR mais utilizados são: levantamento de peso, treinamento com alavancas, estimulação elétrica em animal inconsciente e subida em escada (Seo, Lee *et al.* 2014).

O modelo experimental de TR escolhido na presente tese foi o de subida em escada, um modelo amplamente utilizado (Shiguemoto, Prestes *et al.* 2012, Ahles, Singh *et al.* 2013, Cassilhas, Reis *et al.* 2013, Sanches, Conti *et al.* 2014). Nele, os ratos são treinados para subir em uma escada especialmente projetada (54 degraus). Os animais são inicialmente familiarizados com a escada e a intensidade (percentual da carga máxima presa à cauda) e o volume (número de repetições) do treinamento são progressivamente aumentados. A escada é considerada um exercício resistido, visto que as fibras dos músculos gastrocnêmio, sóleo, flexor longo dos dedos e plantar podem adquirir massa e, portanto, garantir a hipertrofia muscular (Cassilhas, Lee *et al.* 2012). As vantagens desse modelo de TR são: características muito similares ao TR progressivo em humanos; menos estressantes após a familiarização; prática voluntária e sem estímulos aversivos (choques elétricos) para manter o desempenho e sem privação de ração e água (Seo, Lee *et al.* 2014). A Figura 2 exibe os possíveis mecanismos cardioprotetores do TR na cardiotoxicidade induzida por Dox, mas deve se ressaltar que são suposições, uma vez que nenhum desses mecanismos foi testado.

Figura 2 - Possíveis mecanismos cardioprotetores do treinamento resistido na cardiomiopatia induzida por doxorubicina



Legenda: Dox, doxorubicina.

Fonte: Adaptado de: Naaktgeboren *et al.*, 2021.

1.2.2 Treinamento resistido na toxicidade induzida por doxorubicina

Até aonde se sabe, apenas dois estudos investigaram os efeitos do TR em modelo experimental de toxicidade induzida por Dox. Pfannenstiel e Hayward (2018) foram pioneiras na investigação sobre os efeitos do TR na cardiotoxicidade induzida pela Dox. Neste estudo, os animais permaneceram em gaiolas que permitiram uma elevação progressiva em busca de água e comida, encorajando os animais a se levantarem para uma postura bípede. A Dox (12,5 mg/kg, dose única) foi administrada após 12 semanas de TR. Os resultados sugeriram que o exercício resistido pode preservar a função cardíaca e prevenir alterações deletérias na distribuição das isoformas da cadeia pesada de miosina cardíaca (Pfannenstiel and Hayward 2018).

Feitosa *et al.* (2021) demonstraram que 8 semanas de TR, utilizando um aparelho de agachamento personalizado, atenuou a toxicidade cardiovascular induzida por Dox (2,5 mg/kg, 1x/sem, por 6 sem). Os achados foram a preservação do controle autonômico cardíaco, hemodinâmica, função ventricular esquerda e atenuação do estresse oxidativo (Feitosa, Carvalho *et al.* 2021). A Tabela 1 exibe um resumo dos estudos que verificaram os efeitos do TR na toxicidade induzida por Dox. Até então, os estudos sugerem um efeito cardioprotetor do TR e, com o presente estudo, pretendemos ampliar o entendimento dos seus efeitos sobre a estrutura e a função cardíaca e também vascular.

Tabela 1 - Resumo dos estudos que verificaram os efeitos do exercício resistido na toxicidade induzida por doxorrubicina

Estudo	Espécie	Idade ou peso	Administração da Dox (dose; via)	Momento do exercício	Tipo de TR	Duração do treinamento	Protocolo	Principais achados
Pfannestiel <i>et al.</i> 2018	Ratos Sprague-Dawley machos	10 sem	12,5 mg/kg em dose única; i.p.	Antes da administração da Dox	Elevação por comida e água	Diariamente por 12 sem	Altura da grade foi aumentada de 20,32 cm para 35,5 cm	↓ da distribuição da isoforma de cadeia pesada de beta miosina cardíaca
Feitosa <i>et al.</i> 2021	Ratos Wistar machos	300-350 g	2,5 mg/kg semanalmente durante 6 sem; i.p.	Concomitantemente à administração da Dox	Agachamento	3x/sem por 8 sem	3 séries de 10 repetições a 40% de 1 RM, com intervalo de 60 seg	↓ PAD ↓ FC ↓ Tônus simpático ↓ Estresse oxidativo

Legenda: Dox, doxorrubicina, i.p., intraperitoneal; RM, repetição máxima; PAD, pressão arterial diastólica; FC, frequência cardíaca.

1.3 Justificativa

Em função dos avanços no seu diagnóstico e tratamento há um crescente número de sobreviventes do câncer. Um entendimento dos efeitos adversos ao seu tratamento, que muitas vezes podem ser permanentes para o paciente, é fundamental para a melhoria da sua qualidade de vida. Dentre os efeitos adversos permanentes, um dos mais reconhecidos é o desenvolvimento de cardiomiopatia com o uso de Dox. As doenças cardiovasculares são, inclusive, a segunda causa de mortalidade dentre os sobreviventes do câncer, ficando atrás da recidiva da doença. Infelizmente, ainda não há estratégias eficazes e bem estabelecidas para a sua prevenção. Diversos estudos pré-clínicos têm sugerido um efeito cardioprotetor do exercício aeróbio e, há cerca de 10 anos, o principal órgão relacionado à medicina esportiva (*American College of Sports Medicine*) sugeriu que o exercício físico possa ser uma intervenção não farmacológica eficaz e segura para sobreviventes do câncer. As evidências, novamente, são decorrentes de estudos com treinamento aeróbio, o que faz com que um melhor entendimento sobre os possíveis benefícios de outras modalidades de treinamento seja necessário. Dessa forma, neste projeto decidimos investigar os efeitos do TR que pode ter ações cardiovasculares promissoras.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Verificar o impacto do TR sobre a estrutura e função cardíaca e vascular em um modelo experimental de cardiotoxicidade induzida por Dox.

2.2 Objetivos específicos

Este estudo teve como objetivos específicos:

- a) avaliar quanti- e qualitativamente as alterações morfológicas induzidas pelo TR na cardiomiopatia induzida por Dox;
- b) examinar as alterações induzidas pelo TR na função ventricular esquerda em um modelo de cardiomiopatia induzida por Dox;
- c) investigar os efeitos do TR na responsividade contrátil e dilatadora vascular na cardiomiopatia induzida por Dox.
- d) investigar possíveis alterações moleculares cardíacas e vasculares causadas pelo TR na cardiomiopatia induzida por Dox.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Ética na pesquisa

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) sob inscrição nº 23/2015 (ANEXO A). O presente estudo foi realizado de acordo com as diretrizes do *US National Institute of Health*.

3.2 Animais

Foram utilizados 36 ratos machos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Sprague Dawley*, com idade inicial de 8 semanas de vida e peso compreendido entre 270 – 300 gramas, obtidos e mantidos pelo Biotério do Departamento de Farmacologia e Psicobiologia, localizado no IBRAG/UERJ.

Os animais foram mantidos em rack ventilado (Ventilife[®], Alesco, Brasil), com até 4 animais em cada gaiola, sob as mesmas condições de temperatura (~23° C), umidade, ruído, ciclo de luminosidade de 12 horas, com luzes acesas às 6 horas e terminando às 18 horas, e livre acesso à água potável e ração industrializada específica para roedores (Nuvilab[®]) durante todo o protocolo experimental.

3.2.1 Grupos experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais, sendo:

- a) Controle (n=10): animais que receberam infusão intraperitoneal de solução salina;
- b) Dox (n=16): animais que receberam infusão intraperitoneal de Dox;

c) Dox+TR (n=10): animais que receberam infusão intraperitoneal de doxorrubicina e realizaram TR (descrito a seguir).

O grupo Dox teve uma amostra inicialmente maior considerando a mortalidade esperada de cerca de 30%.

3.3 Administração da doxorrubicina e solução salina

O cloridrato de Dox (Adriplastina[®], Pfizer, Brasil) foi administrado por infusão intraperitoneal, diariamente, durante 10 dias consecutivos, em dose de 1 mg/kg (dose total: 10 mg/kg). Os animais do grupo controle receberam solução salina (NaCl, 0,9%) em paralelo, de acordo com o mesmo protocolo (Hayward e Hydock, 2007). A escolha do protocolo de administração foi determinada com base no estudo de Hayward e Hydock (2007) que compararam três protocolos e observaram que todos levaram ao desenvolvimento de cardiomiopatia, mas que, quando feito na dose de 1 mg/kg por 10 dias, a sobrevivência dos animais foi maior, o que possibilitaria a realização do treinamento. A representação esquemática de todo protocolo experimental pode ser visualizada na figura 3.

Figura 3 - Representação esquemática do protocolo experimental



Legenda: Sem, semana; Dox, doxorrubicina; Sal, solução salina 0,9%; TR, treinamento resistido.

3.4 **Medida da massa corporal**

Os animais tiveram sua massa corporal mensurada semanalmente, a partir da 8ª semana durante todo o curso do experimento, sempre no turno da manhã, em balança digital com resolução de 0,01 g (Mark S[®], Bel Engineering, Itália).

3.5 **Controle da ingestão alimentar**

O controle da ingestão alimentar foi realizado diariamente, sempre no turno da manhã, com todo o restante do dia anterior sendo desprezado, assim obtivemos o controle da ingestão alimentar (g/animal/dia).

3.6 **Treinamento resistido**

3.6.1 Protocolo

Os animais do grupo Dox+TR realizaram sessões de exercício resistido cinco vezes na semana (segunda a sexta-feira), durante 8 semanas, (total: 40 sessões). O treinamento consistiu na escalada em escada vertical de 54 degraus. Foram realizadas 15 repetições com 1 minuto de intervalo entre as tentativas. A intensidade do treinamento foi gradualmente aumentada entre 20 a 60% da carga máxima (determinada pelo Teste de Carga Máxima, descrito em 3.6.2) acoplada a sua cauda (Sanches *et al.*, 2014). A progressão do treinamento está representada na Tabela 2. O teste e o treinamento em si foram precedidos por um período de uma semana de adaptação. Nesse período, os animais exploraram a escada, foram colocados nos degraus mais baixos e depois direcionados a subir com leves toques em seu dorso. Após três dias, os animais já estavam subindo voluntariamente a escada. Na figura 4 está representada a utilização da escada.

Figura 4 - Escada utilizada no treinamento resistido



Tabela 2 - Detalhes da prescrição do treinamento resistido

1ª semana		2ª semana		3ª semana		4ª semana		5ª semana		6ª semana		7ª semana		8ª semana	
Nº de subidas*	% da CM	Nº de subidas*	% da CM	Nº de subidas*	% da CM	Nº de subidas*	% da CM	Nº de subidas*	% da CM	Nº de subidas*	% da CM	Nº de subidas*	% da CM	Nº de subidas*	% da CM
2	0	1	0	2	0	1	0	1	0	1	0	2	0	1	0
3	20	1	20	1	20	1	20	1	20	1	30	2	40	2	40
2	30	4	30	2	30	1	30	2	30	2	40	3	50	4	50
2	40	3	40	2	40	2	40	2	40	3	50	3	60	5	60
2	30	4	30	1	50	2	50	3	50	2	60	3	50	2	50
2	20	1	20	2	40	2	40	2	40	3	50	1	40	1	40
2	0	1	0	2	30	2	30	2	30	1	40	1	0	1	0
				1	20	1	20	1	20	1	30				
				2	0	1	0	1	0	1	0				

Legenda: CM, carga máxima; (*) 1 min de intervalo entre as tentativas.

3.6.2 Teste de carga máxima

Os animais de todos os grupos realizaram o teste de carga máxima, que consistiu na escalada em escada vertical com o máximo de carga possível acoplada em sua cauda. Inicialmente, foi realizado aquecimento com o peso corporal. Foi utilizada na primeira tentativa uma carga de 75% da massa corporal presa à cauda do animal, que foi aumentada em 15% a cada tentativa sucessiva de subida, até que o animal não conseguisse mais realizar o procedimento. Foram realizadas no máximo seis tentativas. O teste de força foi realizado em

três momentos: 1) basal – na primeira semana; 2) intermediário – no final da quarta semana; 3) final – no final da oitava semana. Os animais passaram por uma familiarização prévia antes dos testes.

3.7 Avaliação da função cardíaca

A análise da função cardíaca foi realizada em dois momentos: antes do início do treinamento e da administração de Dox (basal) e após 8 semanas de TR. Após anestesia com isoflurano 2%, as imagens foram obtidas utilizando-se um sistema ecocardiográfico MyLab™ Five (Megas/ Esaote, Itália), equipado com um transdutor de 10 MHz. A medida da fração de ejeção foi feita pelo método de Teichholz a partir de imagens adquiridas no eixo paraesternal longo no modo M. A partir das medidas do diâmetro diastólico final do VE e do diâmetro sistólico final do VE, foram calculados os volumes sistólico e diastólico e a fração de ejeção no modo M.

3.8 Eutanásia e isolamento de órgãos

Ao término da oitava semana do protocolo experimental, ou seja, sete semanas após a administração de Dox, os animais foram eutanasiados com uma superdose de tiopental sódico (90 mg/kg, intraperitoneal). Em seguida, foi realizada uma esternotomia mediana e pericardiotomia, para a coleta de sangue da aorta em tubos contendo heparina. O coração foi removido para análises de *Western Blotting* e para microscopia óptica e eletrônica. O volume do coração foi estimado de acordo com o método de submersão, no qual o deslocamento de solução salina 0,9% do volume de cada órgão foi registrado a partir do peso do órgão (Scherle, 1970). Foram removidos o leito arterial mesentérico (LAM) para o estudo da reatividade vascular. Para *Western Blotting*, os fragmentos VE e da aorta abdominal (AA) foram imediatamente congelados a -80°C . A tibia esquerda foi retirada e teve seu comprimento medido para padronização das massas relativas (cardíaca, ventricular esquerda e corporal).

3.9 Análises histológicas

3.9.1 Microscopia de luz

O VE foi isolado, limpo e imediatamente fixado em paraformaldeído a 4%, substituídos 72 horas após uma nova solução de paraformaldeído na mesma proporção (para remoção de resquícios de sangue), e mantidos em temperatura ambiente durante 48 horas. Posteriormente, os fragmentos foram lavados em água corrente e iniciado o processo de desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico (70%, 90% e 100%). Em seguida, os fragmentos foram incluídos em blocos de parafina (Sigma-Aldrich, EUA), cortados em micrótomo (5 μm) e corados de forma específica para cada análise. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para medir a área de seção transversa dos cardiomiócitos. Também foi corado por tricromo de Masson, em que as estruturas são demonstradas em três cores: núcleos em roxo - hematoxilina; citoplasma em vermelho - fucsina ácida; e colágeno em azul - azul de anilina, para avaliar a área de fibrose intersticial. Para as análises, cinco imagens de forma aleatória, de cortes não consecutivos, de 5 animais de cada grupo foram capturadas (formato TIFF, colorida, 36-bit, 1280-1024 pixels, objetiva 40x), analisando-se as médias entre os grupos. As imagens foram coletadas com o auxílio de um microscópio óptico (Olympus) e através da lupa ZEISS SteREO Discovery.V8. As imagens foram analisadas pelo software de análise de Image-Pro Plus.

3.9.2 Microscopia eletrônica

Fragmentos do VE foram fixados em solução contendo 2,5% de glutaraldeído (Riedel-de-Haen, Alemanha) em tampão cacodilato 0,1M (pH 7,2) e 0,25% de ácido tânico (Merck). Após a fixação, as amostras foram lavadas três vezes, por 15 minutos em 0,1 M de tampão imidazol (pH 7,5) e foram pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% (Sigma), 0,8% de ferrocianeto de potássio em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2) durante uma hora, e posteriormente, desidratados em acetona e incluídos em Epon (Embed-812). Cortes semifinos de um micrômetro (1 μm) de espessura foram corados com azul de toluidina e observados sob

microscopia de luz para selecionar as áreas de interesse e posteriormente, realizar cortes ultrafinos no ultramicrotomo (Leica Ultracut). Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados no microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1200EX (JEOL, EUA) em 80 kV.

3.10 Biomarcadores de estresse oxidativo

Para os ensaios de biomarcadores de estresse oxidativo, fragmentos do VE foram homogeneizados em tampão PBS (1 mg tecido para 100 mL de tampão). O homogenato resultante foi centrifugado a 10.000 rpm a 4°C por 10 min e o sobrenadante foi armazenado. A dosagem de proteínas foi determinada usando ensaio colorimétrico pelo método do ácido bicinonínico (kit PierceTM BCA Protein Assay, Thermo Fisher Scientific, EUA) com a leitura sendo realizada a 540 nm.

3.10.1 Atividade da enzima catalase

Foram utilizados 60 µL de homogenato de VE em cubetas de quartzo. Em cada cubeta, foram adicionados 1940 µL de tampão fosfato salino (PBS) com peróxido de hidrogênio (H₂O₂), sendo 25 mL de PBS para 40 µL de H₂O₂. A CAT é uma hemeproteína que catalisa a degradação do H₂O₂. Na reação, uma das moléculas do H₂O₂ é oxidada e a outra é reduzida, formando oxigênio molecular e água, respectivamente. A leitura foi realizada nos tempos de 0, 30 e 60 segundos, numa absorvância de 240 nm (GenesysTM10S UV-Vis Spectrophotometer, ThermoFisher Scientific, EUA).

3.10.2 Atividade da enzima glutathiona peroxidase

Foram adicionados a uma cubeta 200 µL da suspensão de homogenato de VE e 1800 µL de PBS que continha glutathiona reduzida (GSH), glutathiona redutase (GR) e azida sódica,

sendo 20 mL de tampão para 4 mL de GSH + 4 mL de GR + 1 mL de azida sódica. A amostra ficou incubada nesse tampão por 10 minutos. Após o tempo de incubação, NADPH (10 mM) foi adicionado ao meio e foram realizadas as leituras em um intervalo de cento e oitenta segundos. Posteriormente, H₂O₂ (3%) foi adicionado e uma nova leitura foi realizada por duzentos e quarenta segundos. A determinação da atividade da GPx foi realizada a partir da taxa de decaimento da NADPH, determinada por espectrofotômetro, no comprimento de onda de 340 nm (Genesys™10S UV-Vis Spectrophotometer, ThermoFisher Scientific, EUA).

3.10.3 Avaliação da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi avaliada através da formação de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Foram utilizados 100 µL de homogenato de VE em duplicata, os quais foram misturados com ácido tricloroacético a 10%, em seguida as amostras foram centrifugadas e incubadas com ácido tiobarbitúrico 0,67% por 30 minutos a 96°C. As amostras foram colocadas em microplacas.

3.10.4 Avaliação da carbonilação de proteínas

Foram utilizados 100 µL de homogenato de VE em duplicata. Foi realizada uma lavagem com solução de HCl-Acetona, TCA 10%. Na lavagem, as amostras foram centrifugadas por 2 min a 2000 g e o sobrenadante foi descartado. Uma parte das amostras foi incubada com 2,4-dinitrofenilhidrazina e outra parte incubada com HCl 2M por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado. Todas as amostras foram incubadas com guanidina 6M a 60°C por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas e foi realizada a leitura da absorbância do sobrenadante por espectrofotômetro a 370 nm Genesys™10S UV-Vis Spectrophotometer, ThermoFisher Scientific, EUA).

Este método é utilizado para dosagem de oxidação de proteínas que se baseia no princípio de que vários radicais livres atacam resíduos de proteínas como aminoácidos (histidina, arginina, lisina e prolina) para produzir produtos com o grupo carbonila, o qual

pode ser medido através da reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). A DNPH reage com proteínas carboniladas, formando uma base para produzir a hidrazona correspondente.

3.11 Expressão proteica por *Western Blotting*

Amostras de VE (100 mg) e da artéria AA (50 mg) foram homogeneizadas utilizando 1000 μ L e 500 μ L, respectivamente, de tampão RIPA e 10 μ L de coquetel de inibidores de proteases e fosfatase (Sigma, EUA). Em seguida, as amostras foram centrifugadas (14000 rpm, 4°C, 15 minutos), o sobrenadante foi separado e as proteínas foram dosadas utilizando o kit BCA. Após esse processo, foram aplicadas 30 μ g de amostra de VE e 20 μ g de AA de proteína dos homogenatos em poços de gel de 10% e 12% de poliacrilamida para eletro-separação de acordo com o tamanho e carga da proteína. Foram fracionadas por eletroforese (200 V, 200 mA, 60 min) em gel Stain Free™ 12% (Bio-Rad, CA, EUA), utilizando-se tampão de corrida Tris/glicina/SDS, e transferidas (15 V, 328 mA, 45 min) para membranas de PVDF (Invitrogen, Califórnia, EUA) em tampão de transferência (48 mM Tris, 39 mM Glicina, 1,3 mM SDS). Para inibir ligações inespecíficas do anticorpo, as membranas foram incubadas (11/2 h) em Tween 20 + tris-buffered saline (T-TBS) acrescido de albumina a 2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 90 minutos. Posteriormente, as membranas foram lavadas com T-TBS e incubadas com os anticorpos primários para cada proteína (overnight, a 4°C):

a) Homogenato de VE:

- ✓ anti-Akt (Santa Cruz Biotechnology, sc-1618; 1:1000);
- ✓ anti-pAkt 1/2/3 (Ser 473) (Santa Cruz Biotechnology, SC-33437; 1:1000);
- ✓ anti-ERK 1/2 (Santa Cruz Biotechnology, sc-135900; 1:1000);
- ✓ anti-pERK 1/2 (Thr202/Tyr204) (Santa Cruz Biotechnology, sc-81492; 1:1000);
- ✓ anti-mTOR (Santa Cruz Biotechnology, sc-8319; 1:500);
- ✓ anti-3-NT (Santa Cruz Biotechnology, SC- 32757;1:1000).

b) Homogenato de AA:

- ✓ anti-eNOS (BD Bioscience, 610297; 1:1000);
- ✓ anti-peNOS (Cell, 95705;1:1000);

- ✓ anti-NOX2, anti-NOX4 (Santa Cruz Biotechnology, SC-30141; 1:1000);
- ✓ anti-3NT (Santa Cruz Biotechnology, SC- 32757;1:1000);
- ✓ anti- α 1-AR (Santa Cruz Biotechnology SC-100291; 1:500);
- ✓ anti- β 2-AR (Santa Cruz Biotechnology, SC 271322; 1:500);
- ✓ anti-AVP receptor 1 (Santa Cruz Biotechnology, SC -517313; 1:500);
- ✓ anti-TIMP (Santa Cruz Biotechnology, SC-5539; 1:100);
- ✓ anti-MMP-2 (Santa Cruz Biotechnology, SC -10736; 1:1000).

Após este período de incubação, utilizamos um anticorpo secundário específico para cada anticorpo primário. As membranas foram novamente lavadas com T-TBS e a detecção das bandas foi feita por quimioluminescência (Clarity Max, BioRad Inc., EUA) no sistema ChrmIDoc XRS+ (BioRad Inc., EUA). O controle de quantidade de proteínas na amostra foi feito pela correção pela intensidade das bandas do gel *Stain Free*TM, que foi revelado por exposição ultravioleta no aparelho ChemiDoc XRS+ (BioRad Inc. EUA). O padrão de peso molecular utilizado foi o Full-Range RainbowTM Molecular Weight Marker (GE Healthcare, EUA). As bandas foram analisadas quantitativamente por densitometria no software Adobe Photoshop CS5 (Adobe System Inc., CA).

3.12 Avaliação da reatividade vascular

3.12.1 Isolamento do leito arterial mesentérico

O leito arterial mesentérico (LAM) foi estendido para o exterior da cavidade abdominal, rapidamente isolado e canulado pela artéria mesentérica superior e envolto em gaze umedecida com solução nutriente de Krebs modificada (composição [em mmol/L]: NaCl 120,0; KCl 4,7; CaCl₂ 2,5; KH₂PO₄ 1,17; MgCl₂ 1,43; NaHCO₃ 25,0; glicose 11,0; EDTA, 0,03) gaseificada com 95% de O₂ e 5% de CO₂ a 37°C utilizando uma bomba peristáltica (MINIPLUS®, Gilson, WI, EUA) a um fluxo constante de 4 mL/min. A pressão de perfusão foi continuamente medida por meio de um transdutor de pressão acoplado a um conversor analógico-digital (PowerLab 4/30, AD Instruments, Austrália) e posteriormente analisada utilizando o software LabChart 7 (AD Instruments, Austrália).

Figura 5 - Leito arterial mesentérico isolado

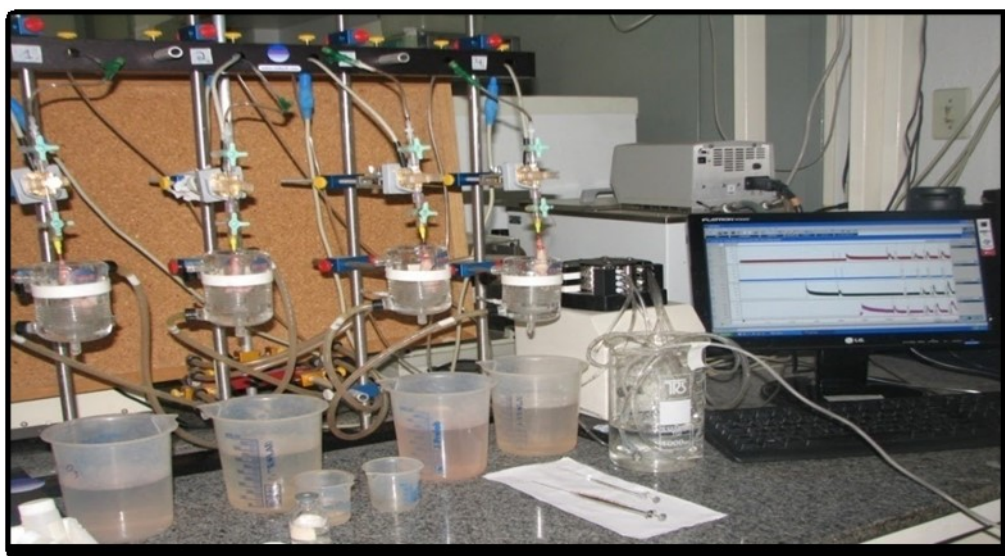


3.12.2 Medida da reatividade vascular as substâncias vasoativas

Os experimentos foram precedidos de um período de 30 minutos de estabilização da preparação, durante o qual a pressão de perfusão basal foi mantida entre 20 a 40 mmHg (Resende *et al.*, 1997) e então foram administradas injeções de 120 μmol de KCl de dez em dez minutos até obter uma resposta consistente. Em seguida, iniciou-se o período de sensibilização vascular, no qual a norepinefrina (NE) foi adicionada à solução de perfusão, em concentração suficiente (10 a 30 $\mu\text{mol/L}$) para que a pressão de perfusão se mantivesse estável em torno de 80 a 100 mmHg. Logo após a obtenção de uma resposta pressora induzida pela NE, testamos a viabilidade do endotélio vascular, com a injeção de acetilcolina (ACh; 1 a 1000 pmol), a qual produz um efeito vasodilatador que é dependente da liberação de óxido nítrico (NO) pelas células endoteliais. Avaliamos também a capacidade dilatadora direta do músculo liso vascular, com a injeção de nitroglicerina (NG; 1 a 1000 nmol), substância que atua diretamente no músculo liso vascular sendo seu efeito independente do endotélio. Em seguida, com o objetivo de avaliar a contratilidade vascular, o LAM foi perfundido com solução de Krebs pura (sem NE), para que a pressão de perfusão voltasse aos níveis basais. Após um período de 10 minutos de estabilização foram realizadas curvas dose-resposta à NE (1 a 1000 nmol). A resposta aos agentes vasodilatadores foi expressa em termos de percentual de contração subtraído da pressão basal. As injeções *in bolus* das substâncias utilizadas nos

experimentos foram realizadas por meio de um injetor acoplado ao sistema de perfusão, por meio de microseringas Hamilton de 10 e 100 μL . O intervalo entre as injeções foi de aproximadamente cinco minutos, permitindo sempre o retorno e estabilização da pressão de perfusão aos níveis anteriores e as injeções foram administradas em volumes que variam de 5 a 50 μL .

Figura 6 - Foto do esquema de perfusão do leito arterial mesentérico



Fonte: Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e Plantas Medicinais, UERJ.

3.13 Análise dos dados

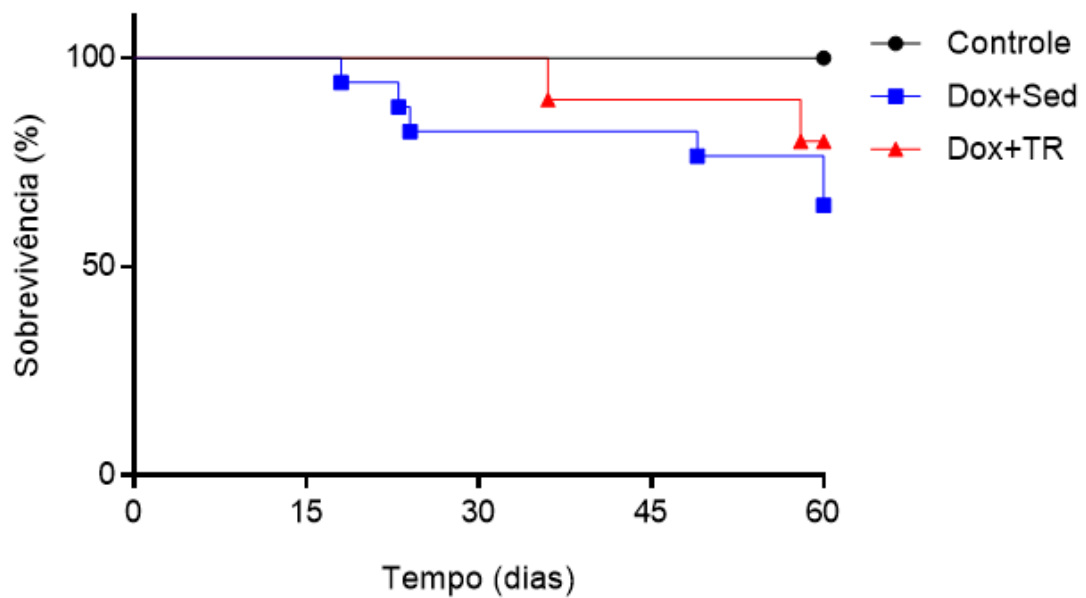
Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). A normalidade dos dados foi confirmada através do teste de Shapiro Wilk. Para a reatividade vascular, a comparação entre as médias foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de duas entradas para medidas repetidas (grupo x dose). Para as demais análises, a comparação foi realizada pela ANOVA de uma entrada. Em caso de F significativo, foi utilizado o pós-teste de Tukey. A diferença nas curvas de sobrevivência entre os grupos foi testada pelo teste Log-rank. O nível de significância estabelecido foi de 5%. As análises dos dados e o preparo dos gráficos foram realizados utilizando o programa estatístico GraphPad Prism[®] versão 8 (GraphPad Inc., San Diego, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Sobrevida

Os resultados da presente tese demonstraram uma elevada mortalidade no grupo Dox+Sed (38%), enquanto no grupo Dox+TR foi observado um efeito protetor do exercício, atenuando a mortalidade (20%). Todos os animais do grupo Controle sobreviveram durante o protocolo experimental. A figura 7 exibe a curva de sobrevida dos grupos estudados.

Figura 7 - Curva de sobrevida



Legenda: Dox, doxorubicina; Sed, sedentário; TR, treinamento resistido (N=10-16).

4.2 Massa corporal, controle da ingestão alimentar, massa cardíaca e massa ventricular esquerda

Não foram observadas diferenças na massa corporal entre os grupos estudados no momento inicial. Contudo, verificamos uma redução significativa da massa corporal nos animais dos grupos Dox+Sed e Dox+TR em comparação ao grupo Controle no momento final (Tabela 4). A Figura 8 ilustra o comportamento da massa corporal durante o período experimental.

Quanto à ingestão alimentar, o grupo Dox+Sed apresentou uma menor ingestão alimentar média em relação aos grupos Controle e Dox+TR. A Figura 9 exibe o acompanhamento da ingestão alimentar ao longo do protocolo experimental. Em relação às massas cardíaca e ventricular esquerda, o grupo Dox+Sed apresentou uma menor massa cardíaca relativa em comparação ao grupo Controle. Não houve diferença significativa entre o grupo DOX+SED e DOX+TR, entretanto o grupo DOX+TR apresentou valores de massa cardíaca semelhante à do grupo controle. As massas do coração e do VE foram relativizadas pelo comprimento da tibia. Não houve diferença entre grupos na massa do coração em valores absolutos e na massa do VE absoluta e relativa (Tabela 3).

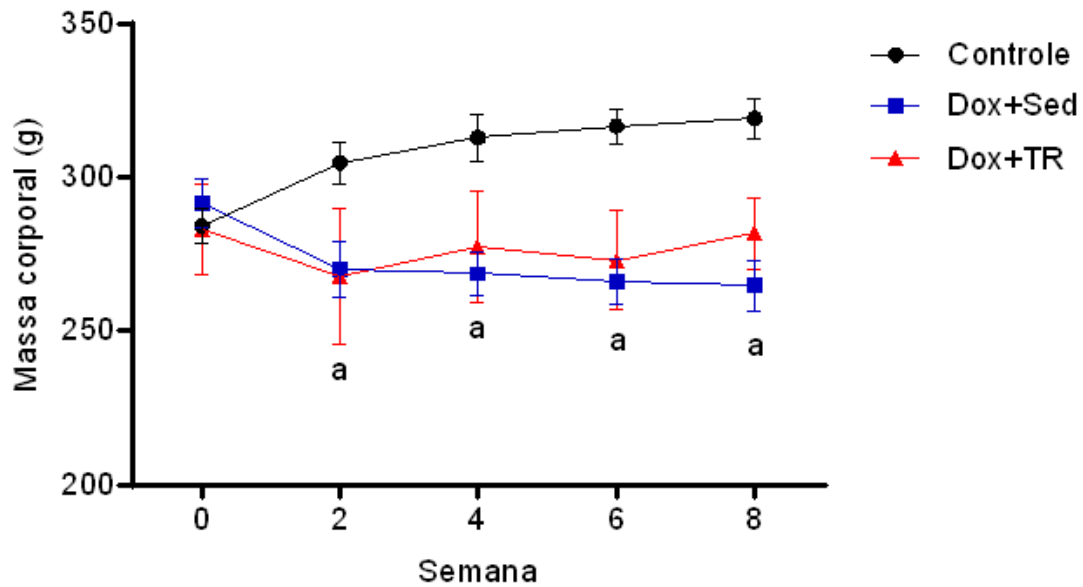
Tabela 3 - Massa corporal, ingestão alimentar, massa cardíaca e massa ventricular esquerda

Características	Controle	Dox+Sed	Dox+TR
Massa corporal - inicial (g)	284,4 ± 5,62	291,9 ± 7,95	283,1 ± 14,76
Massa corporal – final (g)	319,4 ± 6,50	265 ± 8,29 ^a	281,9 ± 11,57 ^a
Ingestão alimentar média (g/dia/rato)	20,34 ± 0,31	17,33 ± 0,86 ^{a,c}	19,23 ± 0,92
Massa cardíaca (g)	1,10 ± 0,03	0,92 ± 0,04	1,03 ± 0,10
Massa cardíaca corrigida pela tibia (g)	0,27 ± 0,01	0,21 ± 0,01 ^a	0,23 ± 0,01 ^a
Massa ventricular esquerda (g)	0,67 ± 0,03	0,61 ± 0,02	0,68 ± 0,03
Massa ventricular esquerda corrigida pela tibia (g)	0,16 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,16 ± 0,01

Legenda: Dox, doxorubicina; Sed, sedentário; TR, treinamento resistido (N=10-16).

Nota: Valores apresentados como média ± EPM. Diferenças significativas ($P \leq 0,05$) comparadas com: a ≠ Controle, c ≠ Dox+TR, determinadas pela ANOVA one-way e pós-teste de Tukey.

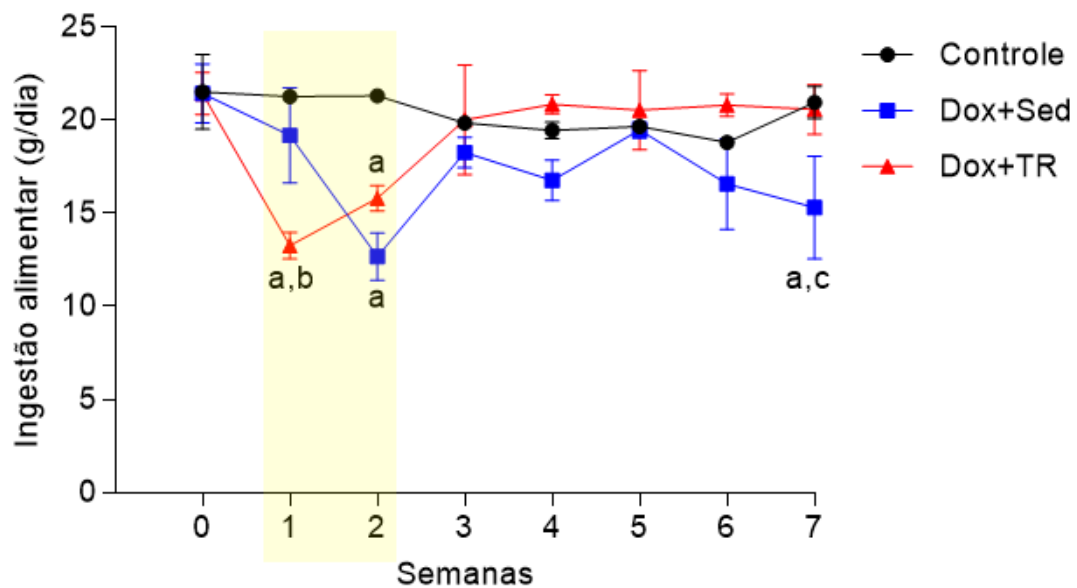
Figura 8 - Acompanhamento da massa corporal ao longo do protocolo experimental



Legenda: Dox, doxorubicina; Sed, sedentário; TR, treinamento resistido (N=10-16).

Nota: Valores apresentados como média \pm EPM. Diferenças significativas ($P \leq 0,05$) comparadas com: a \neq Controle, determinadas pela ANOVA two-way e pós-teste de Tukey.

Figura 9 - Acompanhamento da ingestão alimentar ao longo do protocolo experimental



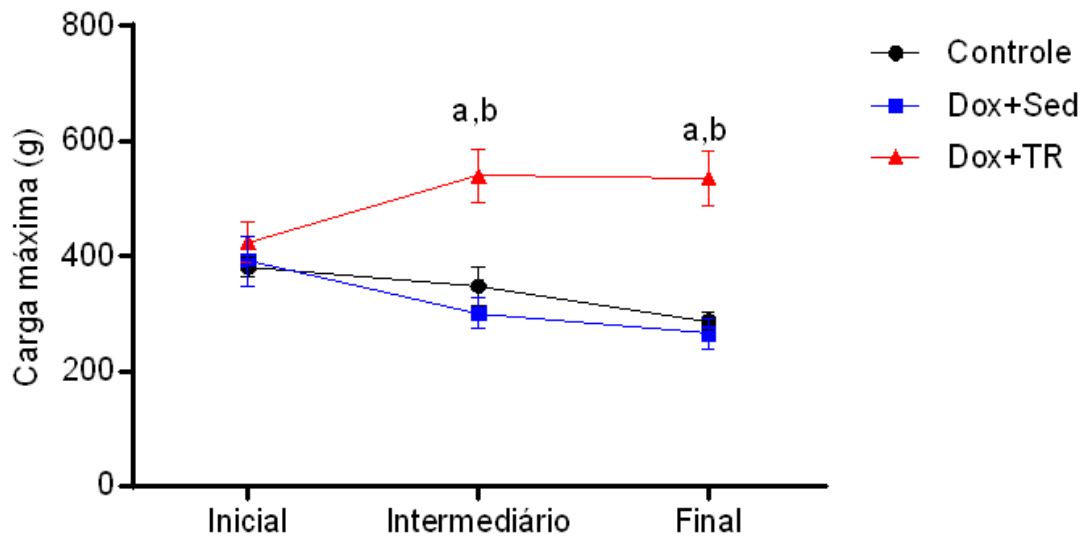
Legenda: Dox, doxorubicina; Sed, sedentário; TR, treinamento resistido (N=10-16)

Nota: A faixa amarelada representa o período de administração da doxorubicina. Valores apresentados como média \pm EPM. Diferenças significativas ($P \leq 0,05$) comparadas com: a \neq Controle, b \neq Dox+Sed, c \neq Dox+TR, determinadas pela ANOVA two-way e pós-teste de Tukey.

4.3 Força muscular

Foram observados aumentos significativos na força muscular, medida pelo teste de carga máxima, do grupo Dox+TR no momento intermediário e final em comparação ao inicial. Na comparação intergrupos, o grupo Dox+TR apresentou valores significativamente mais elevados de carga máxima em comparação aos grupos Controle e Dox+Sed nos momentos intermediário e final. A Figura 10 apresenta os resultados dos testes de força, realizados em diferentes momentos do protocolo experimental.

Figura 10 - Teste de carga máxima



Legenda: Dox, doxorubicina; Sed, sedentário; TR, treinamento resistido (N=10-16)

Nota: Valores apresentados como média ± EPM. Diferenças significativas ($P \leq 0,05$) comparadas com: a ≠ Controle, b ≠ Dox+Sed, determinadas pela ANOVA two-way e pós-teste de Tukey.

4.4 Efeitos do treinamento resistido sobre a morfofuncionalidade cardíaca em ratos tratados com doxorrubicina

4.4.1 Função cardíaca

Os animais do grupo Dox+Sed apresentaram uma redução na contratilidade cardíaca, evidenciada pelo menor volume sistólico e de fração de ejeção do VE em comparação com os grupos Controle e Dox+TR. Além disso, foi observada uma redução do volume sistólico no grupo Dox+Sed em comparação com o Controle. Não foram encontradas diferenças para o volume diastólico final e FC entre os grupos estudados. A tabela 4 apresenta os resultados da função cardíaca dos grupos estudados.

Tabela 4 - Função cardíaca

Características	Controle	Dox+Sed	Dox+TR
Fração de ejeção (%)	76,17 ± 1,40	64,56 ± 1,21 ^a	70,50 ± 0,76 ^{a,b}
Volume diastólico final (mL)	0,22 ± 0,03	0,16 ± 0,01	0,22 ± 0,02
Volume sistólico (mL)	0,17 ± 0,02	0,10 ± 0,01 ^a	0,15 ± 0,01
Frequência cardíaca (bpm)	314,8 ± 31,6	336,2 ± 11,9	315,3 ± 14,7

Legenda: Dox, doxorrubicina; Sed, sedentário; TR, treinamento resistido (N=8)

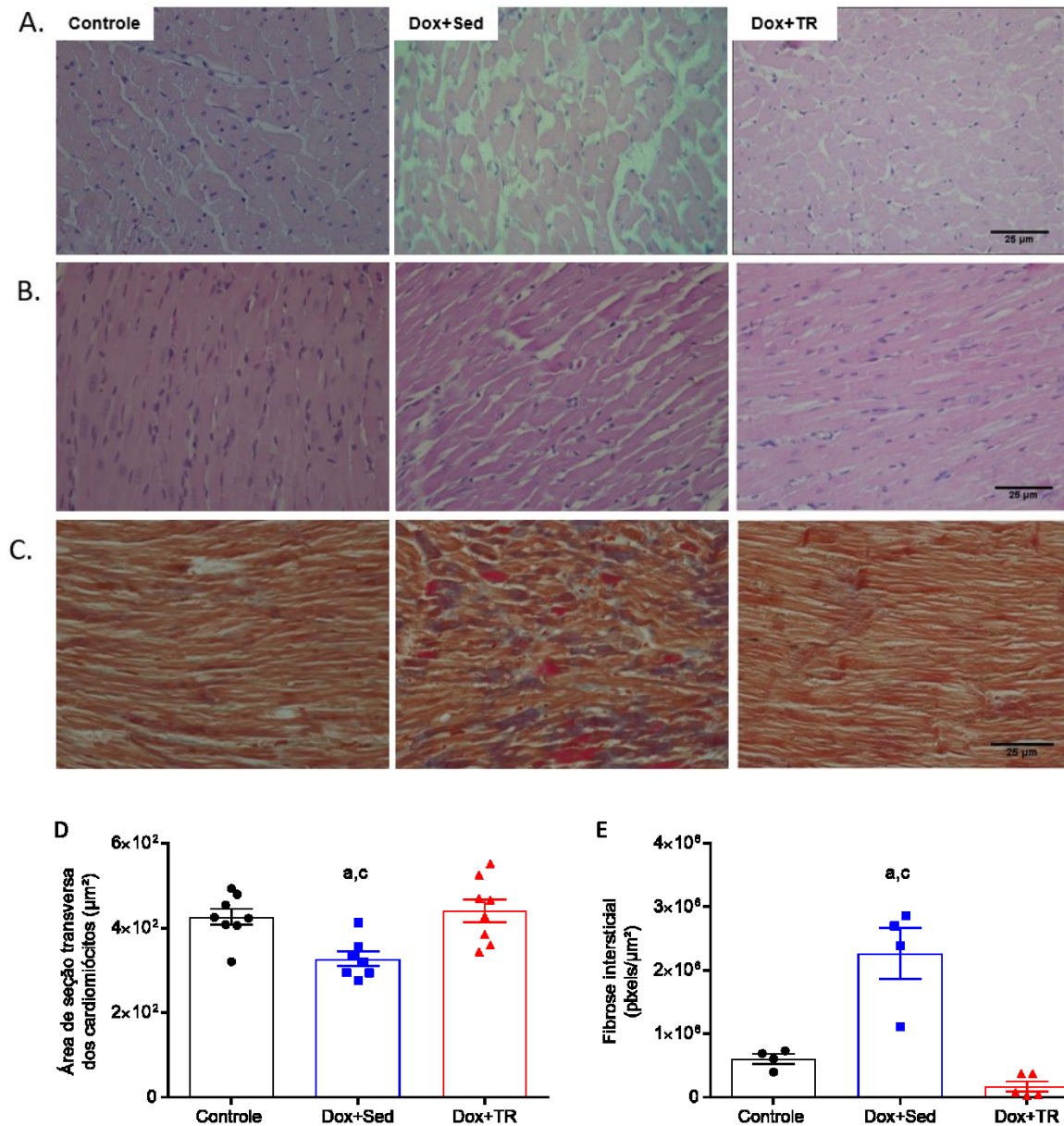
Nota: Valores apresentados como média ± EPM. Diferenças significativas ($P \leq 0,05$) comparadas com: a ≠ Controle, b ≠ Dox+Sed, determinadas pela ANOVA one-way e pós-teste de Tukey.

4.4.2 Análise morfológica do ventrículo esquerdo

O TR foi eficaz em prevenir parte das alterações deletérias ocasionadas pela Dox no VE. As imagens coradas com HE (Figuras 11A e 11B) claramente mostram que os animais do grupo Dox+Sed apresentaram anormalidades estruturais, com perda do alinhamento das fibras do miocárdio e um maior espaçamento entre as fibras. Já no grupo Dox+TR, tais alterações foram atenuadas. A área de seção transversa do cardiomiócitos foi quantificada em cortes transversais do VE corado com HE (Figura 11B). Os animais do grupo Dox+Sed

apresentaram uma área de seção transversa dos cardiomiócitos significativamente menor que os do grupo Controle e Dox+TR (Figura 11D). A coloração com Tricrômico de Masson revelou um aumento significativo de colágeno e fibrose no VE dos animais Dox+Sed (Figuras 11C e 11E), que foi evitado com o TR.

Figura 11 – Fotomicrografias representativas



Le

(corado com HE); (C) corte longitudinal dos cardiomiócitos (corado com Tricrômico de Masson) (N=5)
 Nota: Valores apresentados como média \pm EPM. Diferenças significativas ($P \leq 0,05$) comparadas com: a \neq Controle, c \neq Dox+TR, determinadas pela ANOVA one-way e pós-teste de Tukey. imagens capturas com objetiva de 40x

4.4.3 Análise ultraestrutural dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo

A análise da morfologia ultraestrutural em cardiomiócitos foi feita por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 12). Como esperado, no grupo controle, observou-se uma disposição estrutural normal, com as miofibrilas organizadas em paralelo, sarcômeros preservados, com distância uniforme entre as linhas Z. Observou-se também as mitocôndrias dispostas paralelamente às miofibrilas, em estreito contato com as mesmas, além de depósitos de glicogênio intermiofibrilares. Já os cardiomiócitos do grupo Dox+Sed apresentaram uma grave desestruturação celular, com fragmentação das miofibrilas dos cardiomiócitos, desaparecimento de alguns sarcômeros, aumento de conteúdo citoplasmático elétron-lúcido e presença de autofagossomos. O TR, por sua vez, foi capaz de prevenir algumas dessas alterações, embora ainda seja possível observar uma perda do alinhamento das miofibrilas, assim como das mitocôndrias, que formavam clusters entremeados às miofibrilas.

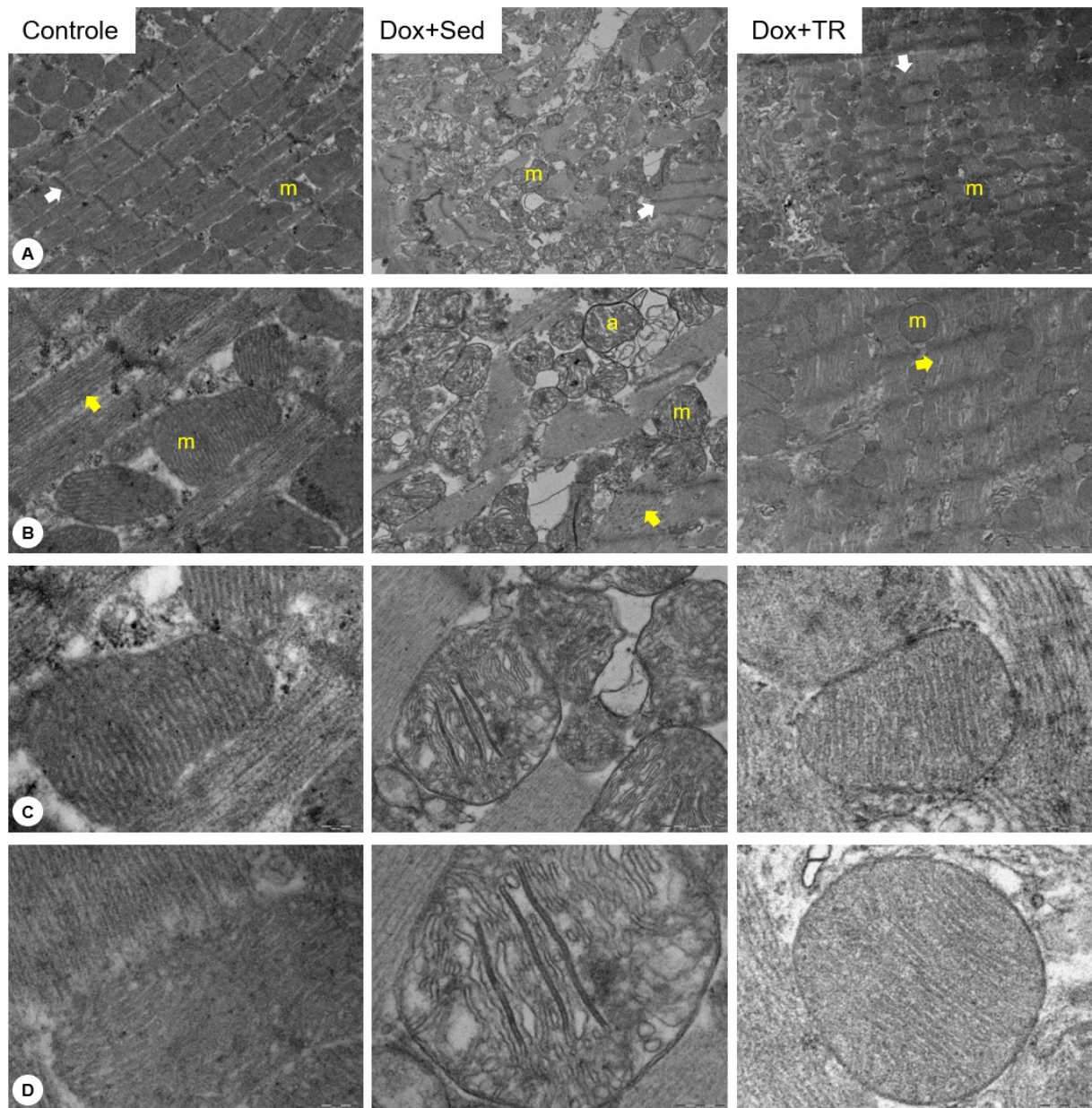
4.4.3.1 Alterações na estrutura das miofibrilas

Como anteriormente mencionado, o grupo Controle apresentou características ultraestruturais normais de cardiomiócitos, com arranjo paralelo de miofibrilas em relação ao eixo longitudinal da célula e com as mitocôndrias (Figura 12, seta amarela). No grupo Dox+Sed, o arranjo linear e paralelo das miofibrilas foi perdido, algumas linhas Z aparentavam onduladas, sem distância uniforme entre duas linhas Z consecutivas. Ainda, houve uma clara fragmentação dos filamentos de actina e miosina, dissolução das miofibrilas e, em algumas áreas, não foram observadas miofibrilas e nem as linhas Z, indicando uma perda completa do aparato contrátil (Figura 12, setas amarela e branca). O TR resultou em efeitos positivos sobre a morfologia ultraestrutural dos cardiomiócitos, com grandes áreas de preservação da organização estrutural do sarcômero, embora ainda seja possível observar uma disposição não linear e paralela e redução da densidade das miofibrilas (Figura 12, seta amarela).

4.4.3.2 Alterações mitocondriais

O grupo Controle apresentou mitocôndrias íntegras, dispostas em paralelo com as miofibrilas, apresentando matriz eletrodensa com a membrana externa e as cristas mitocondriais preservadas. As mitocôndrias foram gravemente afetadas com a administração de Dox. No grupo DoxSed, as mitocôndrias estavam aleatoriamente dispostas, perdendo o arranjo linear e paralelo às miofibrilas. Foram encontradas mitocôndrias nos mais diferentes graus de degeneração. As alterações mais óbvias foram a perda de grânulos de matriz e o aparecimento de áreas eletron-lúcidas, degeneração das cristas mitocondriais, mitocôndrias edemaciadas e dilatadas. Não foram observadas cristas na maioria das organelas. No VE dos grupos Dox+TR, as mitocôndrias encontravam-se majoritariamente preservadas. As figuras 11C e 11D ilustram em detalhes a morfologia da mitocôndria.

Figura 12 – Eletromicrografias representativas de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo



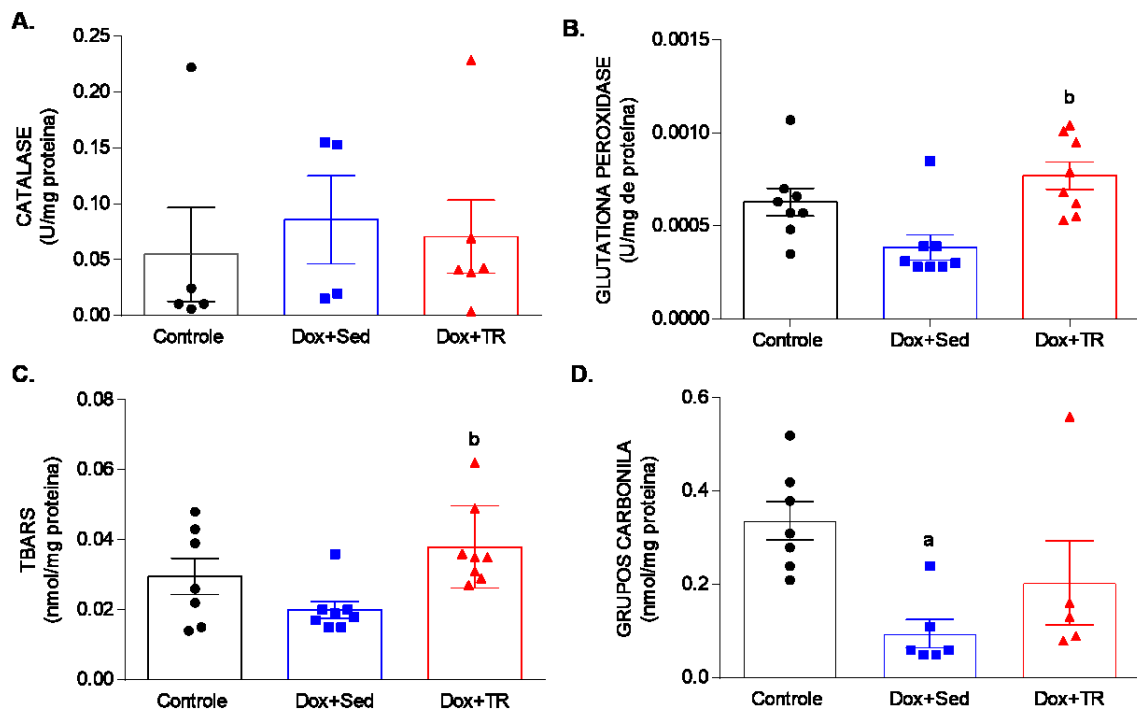
Legenda: a, autofagossomo; m, mitocôndria; seta amarela, miofibrila; seta branca, linha Z (N=3)
 Nota: Imagem ampliada em (A) 6.000x, (B) 15.000x, (C) 60.000x e (D) 80.000x.

4.5 Biomarcadores de estresse oxidativo em homogenato de ventrículo esquerdo

Não foram observadas diferenças na atividade enzimática da CAT nos diferentes grupos estudados (Figura 13A). No entanto, a atividade enzimática da GPx foi maior no grupo Dox+TR quando comparada ao grupo Dox+Sed (Figura 13B).

Além disso, foi observado um aumento na formação de subprodutos da peroxidação lipídica (TBARS) no grupo Dox+TR quando comparado com Dox+Sed (Figura 13C). Também foi observada uma diminuição na carbonilação de proteínas no grupo Dox+Sed em comparação com o grupo Controle, e não houve diferença entre o grupo Dox+TR e os demais grupos (Figura 13D).

Figura 13 – Atividade das enzimas antioxidantes, peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas em homogenato de ventrículo esquerdo



Legenda: Dox, doxorubicina; Sed, sedentário; TR, treinamento resistido. (A) Atividade da catalase; (B) Atividade da glutatona peroxidase; (C) Níveis de malondealdeído; (D) Níveis de carbonil (N=4-8)

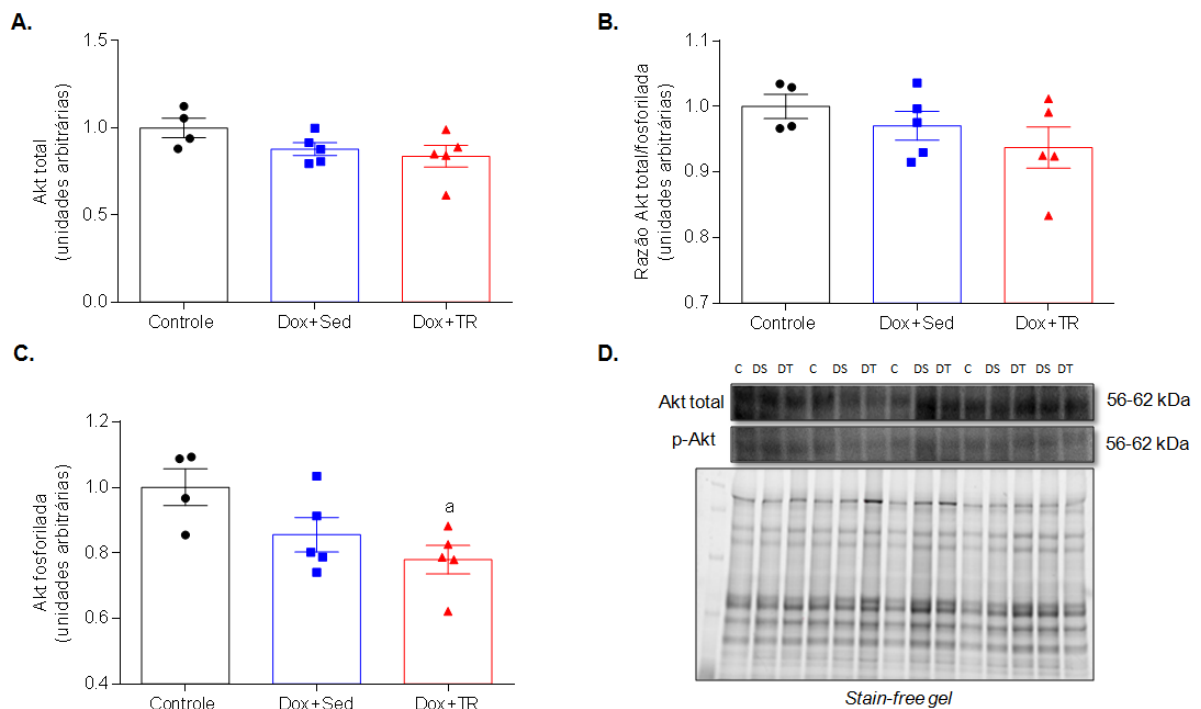
Nota: Valores apresentados como média \pm EPM. Diferenças significativas ($P \leq 0,05$) comparadas com: b \neq Dox+Sed, determinadas pela ANOVA one-way e pós-teste de Tukey.

4.6 Expressão de proteínas em homogenato ventrículo esquerdo

4.6.1 Akt

Os níveis totais da proteína Akt não foram alterados entre os grupos estudados (Figura 14A). Por outro lado, os níveis de Akt fosforilada foram reduzidos no grupo Dox+TR em relação com o grupo Controle (Figura 14C). Não foi observada diferença na relação Akt total/fosforilada entre os grupos estudados (Figura 14B).

Figura 14 – Níveis da proteína Akt em homogenato de ventrículo esquerdo



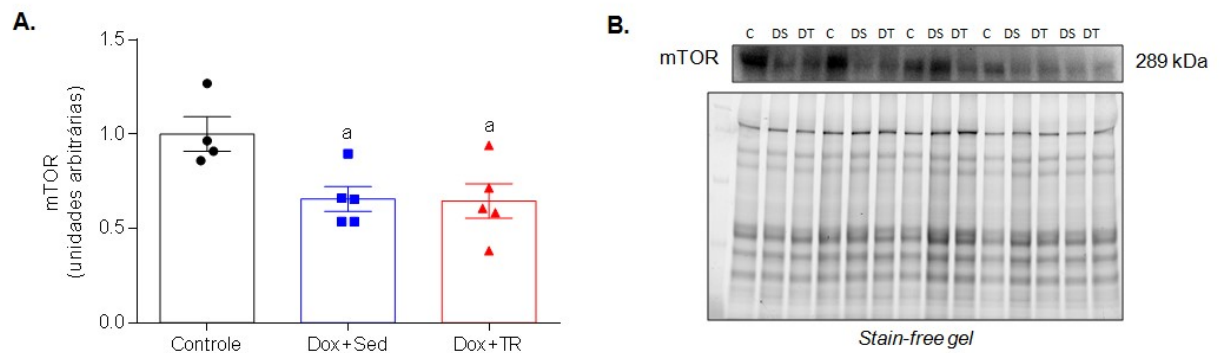
Legenda: Dox, doxorubicina; Sed, sedentário; TR, treinamento resistido. Níveis proteicos de (A) Akt total; (B) Akt t/p; (C) Akt fosforilada; (D) Stain-free gel (N=4-5).

Nota: Valores apresentados como média ± EPM. Diferenças significativas ($P \leq 0,05$) comparadas com: a \neq Controle, determinadas pela ANOVA one-way e pós-teste de Tukey.

4.6.2 mTOR

Os níveis da proteína mTOR foram menores nos grupos tratados com Dox em relação ao grupo Controle (Figura 15).

Figura 15 – Níveis da proteína mTOR em homogenato de ventrículo esquerdo



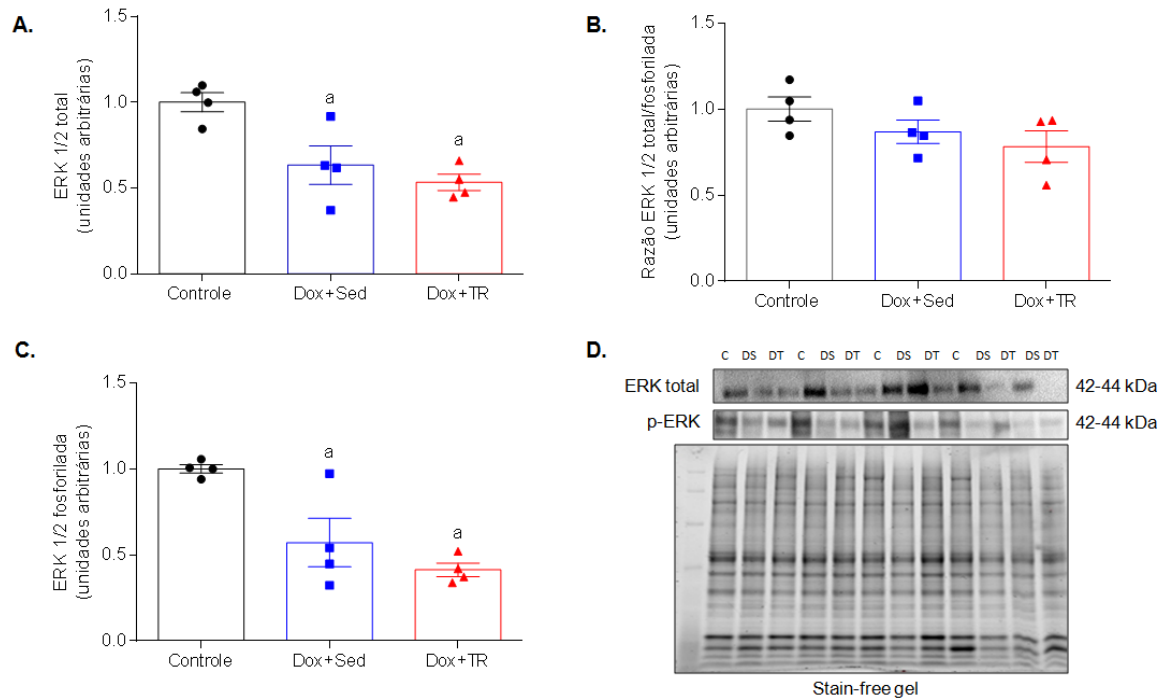
Legenda: Dox, doxorubicina; Sed, sedentário; TR, treinamento resistido. (A) níveis da proteína mTOR; (B) Stain-free gel (N=4-5).

Nota: Valores apresentados como média \pm EPM. Diferenças significativas ($P \leq 0,05$) comparadas com: a \neq Controle, determinadas pela ANOVA one-way e pós-teste de Tukey.

4.6.3 ERK 1/2

Não foram observadas diferenças na razão da expressão proteica de ERK total pela fosforilada. No entanto, quando analisados separadamente, foi possível observar uma redução na expressão proteica da ERK total e fosforilada nos grupos tratados com Dox quando comparados ao grupo Controle.

Figura 16 – Níveis da proteína ERK 1/2 em homogenato de ventrículo esquerdo



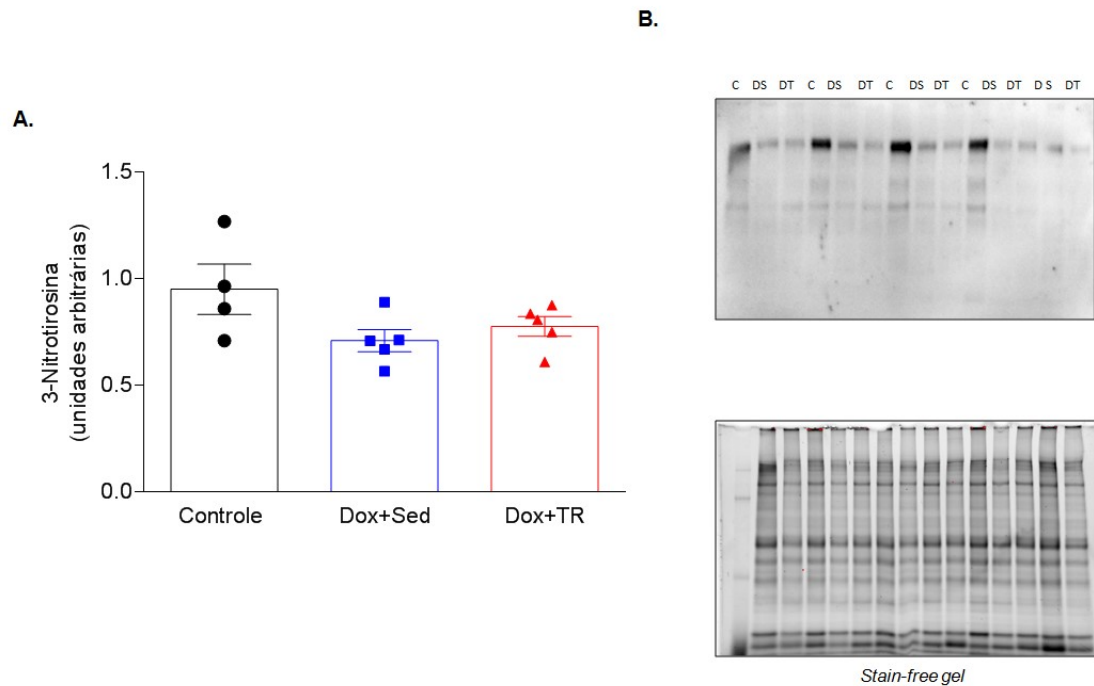
Legenda: Dox, doxorrubicina; Sed, sedentário; TR, treinamento resistido (N=4-5).

Nota: Valores apresentados como média \pm EPM. Diferenças significativas ($P \leq 0,05$) comparadas com: a \neq Controle, determinadas pela ANOVA one-way e pós-teste de Tukey.

4.6.4 3-Nitrotirosina

Não houve diferença na expressão de proteínas nitrosiladas entre os grupos experimentais (Figura 17).

Figura 17 – Níveis de proteínas nitrosiladas em homogenato de ventrículo esquerdo.



Legenda: Dox, doxorubicina; Sed, sedentário; TR, treinamento resistido. (A) níveis da proteína 3-nitrotirosina; (B) membrana; (C) Stain-free gel (N=4-5).

Nota: Valores apresentados como média \pm EPM.

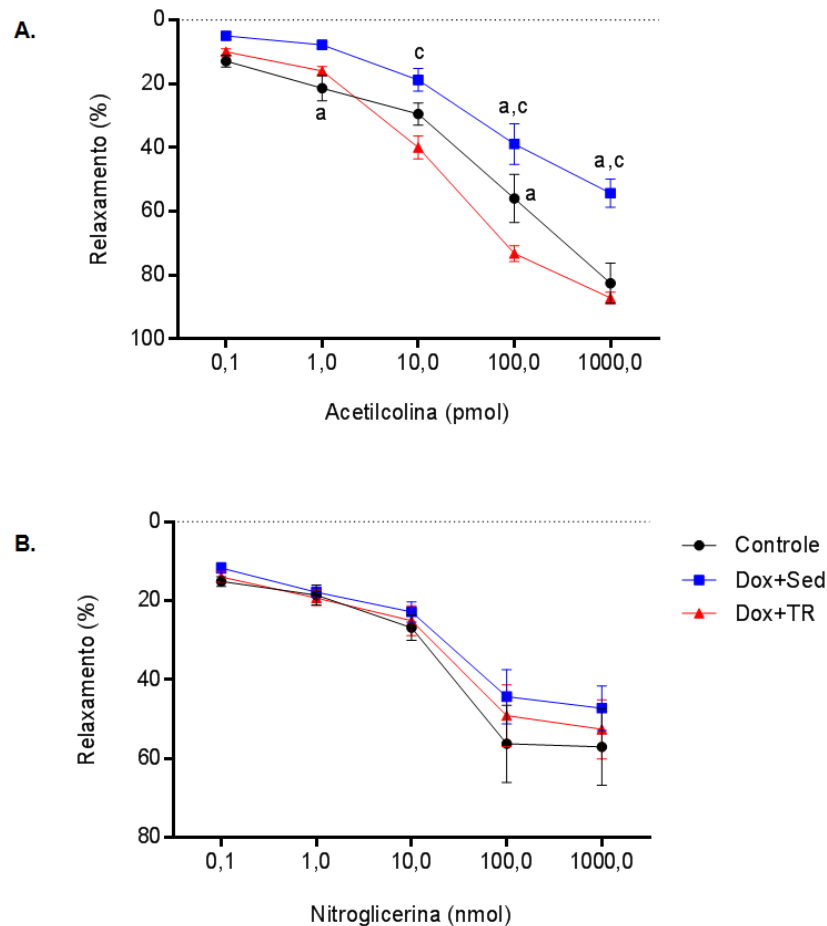
4.7 Reatividade vascular

4.7.1 Efeito do treinamento resistido sobre as repostas vasodilatadoras induzidas por acetilcolina e nitroglicerina em LAM de ratos tratados com doxorubicina

A ACh provocou uma resposta vasodilatadora dose-dependente que esta diminuída no LAM isolado de animais do grupo Dox+Sed, quando comparado aos grupos Dox+TR e Controle (Figura 18A). No entanto, não houve alteração na resposta vasodilatadora induzida pela NG em LAM dos diferentes grupos estudados (Figura 18B).

Figura 18 – Respostas vasodilatadoras induzidas por acetilcolina e nitroglicerina em leito arterial mesentérico

Efeito do treinamento resistido sobre as repostas vasodilatadoras induzidas por acetilcolina e nitroglicerina em LAM de ratos tratados com doxorubicina



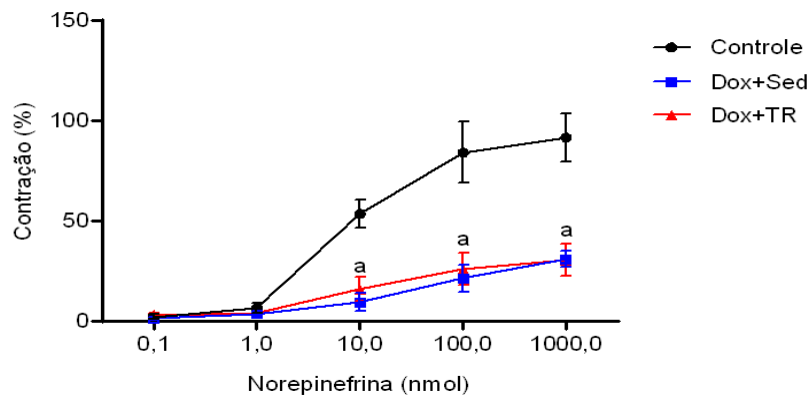
Legenda: Dox, doxorubicina; Sed, sedentário; TR, treinamento resistido. Respostas induzidas por doses crescentes de (A) acetilcolina e (B) nitroglicerina (N=7-8)

Nota: Valores apresentados como média \pm EPM. Diferenças significativas ($P \leq 0,05$) comparadas com: a \neq Controle, determinadas pela ANOVA two-way e pós-teste de Tukey.

4.7.2 Efeito do treinamento resistido sobre as repostas vasoconstritora à norepinefrina em leito arterial mesentérico

Foi observada uma diminuição da responsividade vascular à norepinefrina em ambos os grupos tratados com Dox quando comparados ao grupo Controle (Figura 19).

Figura 19 – Resposta vasoconstrictora induzida por norepinefrina em LAM de ratos tratados com doxorubicina



Legenda: Dox, doxorubicina; Sed, sedentário; TR, treinamento resistido (N=7-8)

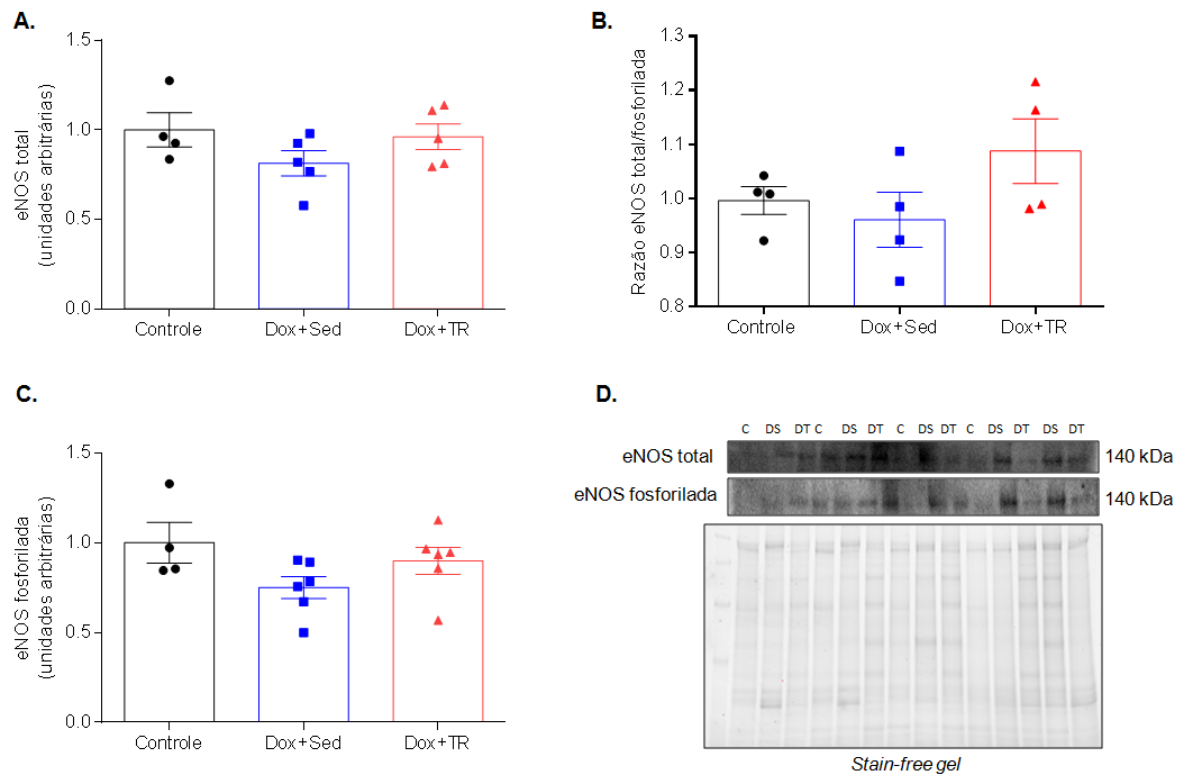
Nota: Valores apresentados como média \pm EPM. Diferenças significativas ($P \leq 0,05$) comparadas com: a \neq Controle, determinadas pela ANOVA two-way e pós-teste de Tukey.

4.8 Expressão de proteínas em homogenato de aorta

4.8.1 eNOS

Não houve diferença estatística da isoforma eNOS da enzima óxido nítrico sintase entre os grupos analisados em homogenato na artéria AA.

Figura 20 – Níveis da proteína eNOS total e fosforilada em homogenato de aorta



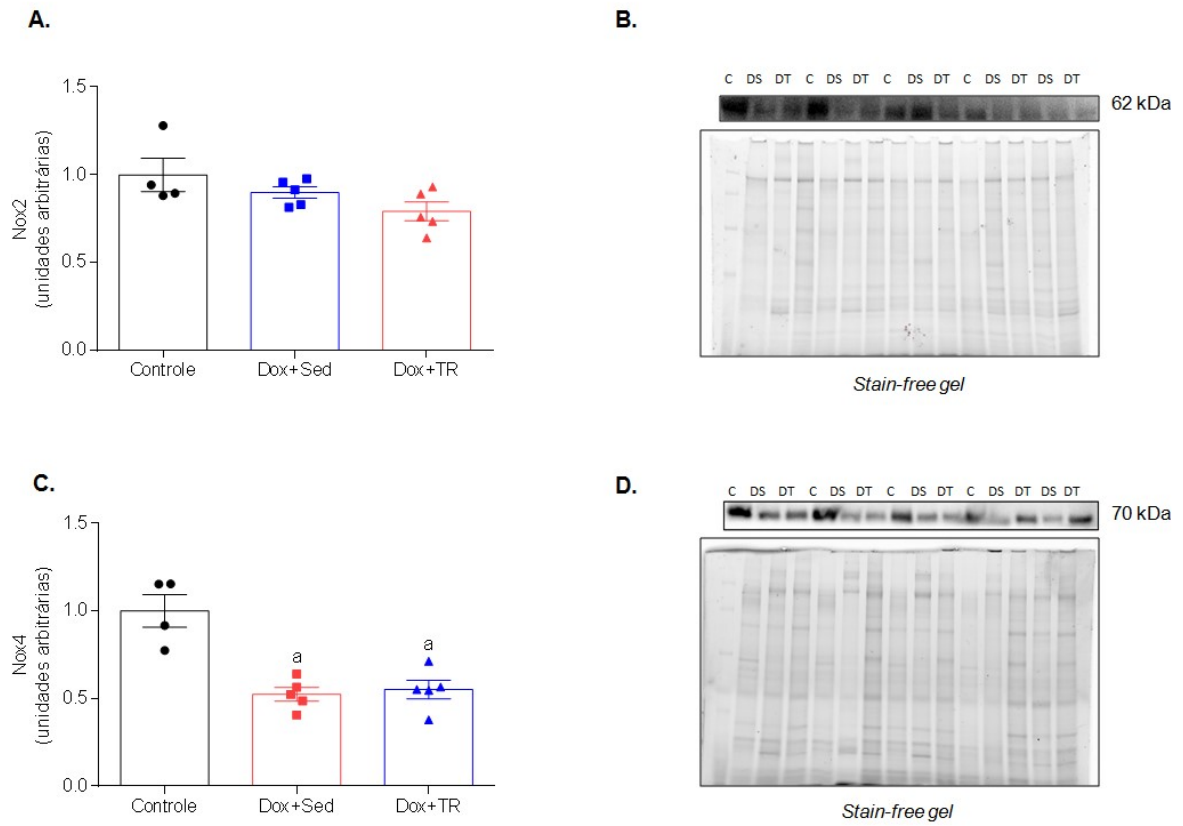
Legenda: Dox, doxorubicina; Sed, sedentário; TR, treinamento resistido (N=4-5).

Nota: Valores apresentados como média \pm EPM. Diferenças significativas ($P \leq 0,05$) comparadas com: a \neq Controle, determinadas pela ANOVA one-way e pós-teste de Tukey.

4.8.2 Nox2 e Nox4

Não houve diferença estatística da isoforma Nox 2 entre os grupos analisados. Porém, houve uma redução na expressão proteica da Nox 4 nos grupos Dox quando comparados ao grupo controle.

Figura 21 - Níveis das proteínas Nox2 e Nox4 em homogenato de aorta



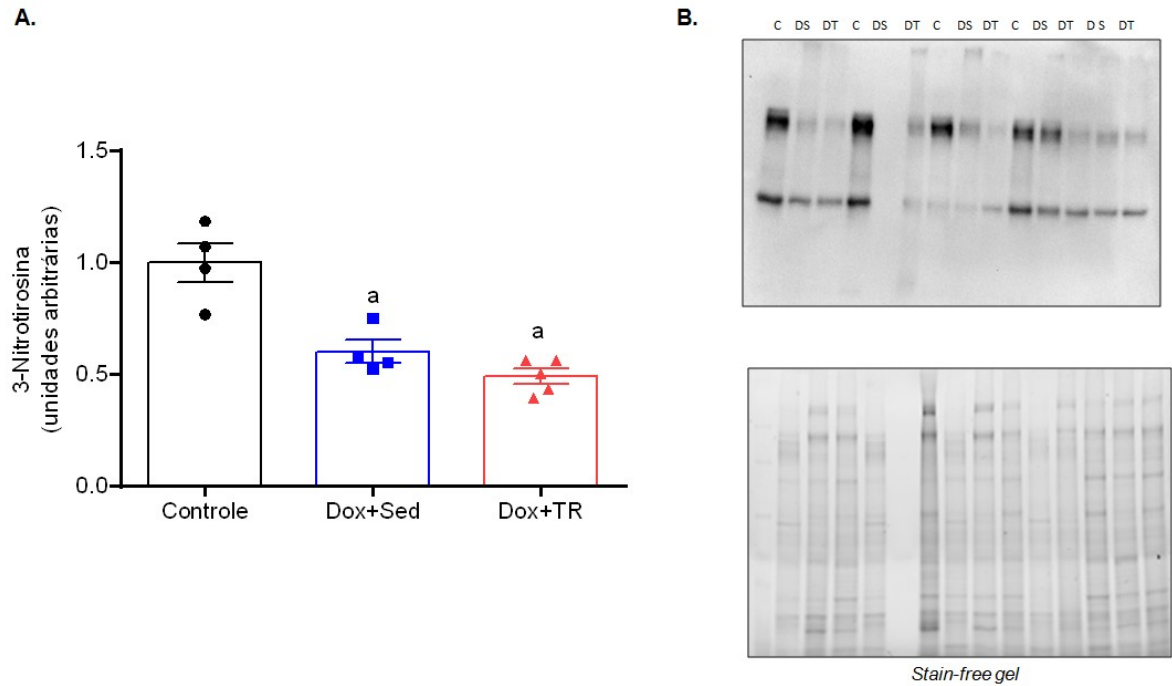
Legenda: Dox, doxorubicina; Sed, sedentário; TR, treinamento resistido (N=4-5).

Nota: Valores apresentados como média \pm EPM. Diferenças significativas ($P \leq 0,05$) comparadas com: a \neq Controle, determinadas pela ANOVA one-way e pós-teste de Tukey.

4.8.3 3-Nitrotirosina

Foi observada uma redução significativa na expressão da 3-nitrotirosina nos grupos Dox+Sed e Dox+TR quando comparados ao grupo controle.

Figura 22 – Níveis de 3-Nitrotirosina em homogenato de aorta



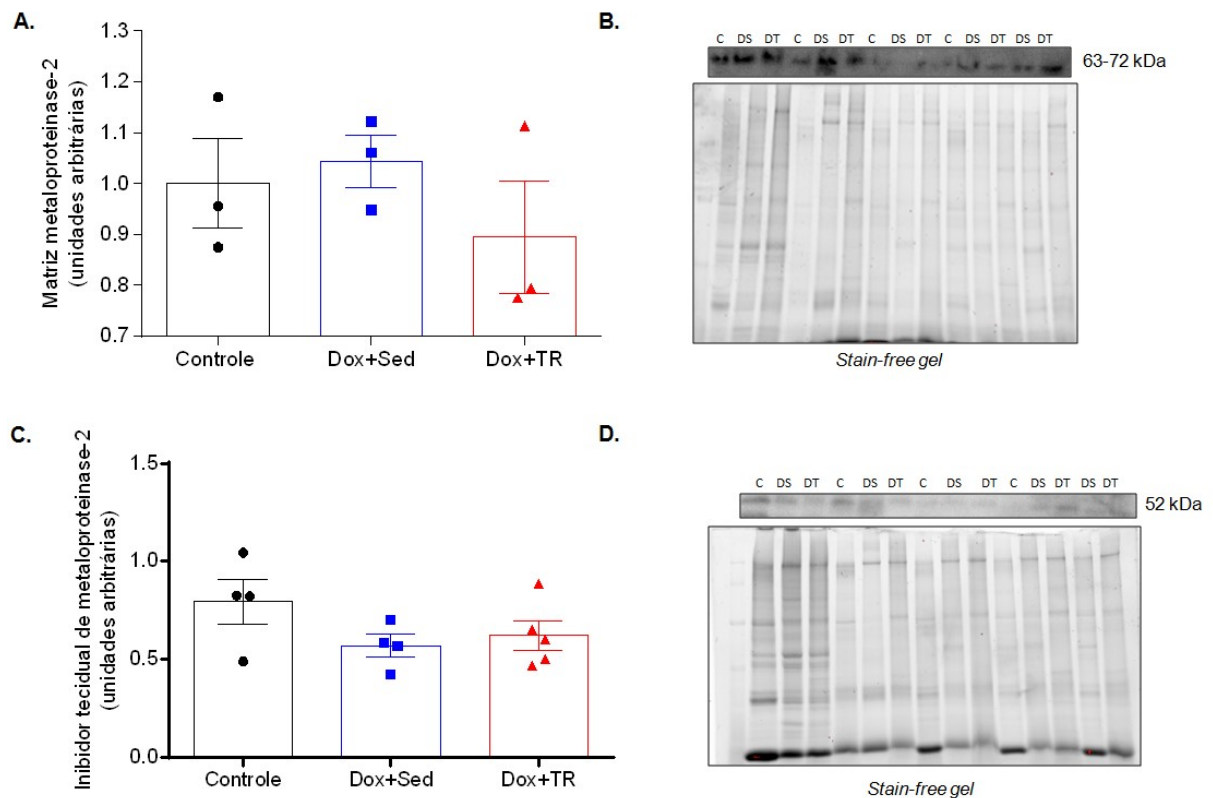
Legenda: Dox, doxorubicina; Sed, sedentário; TR, treinamento resistido (N=4-5).

Nota: Valores apresentados como média \pm EPM. Diferenças significativas ($P \leq 0,05$) comparadas com: a \neq Controle, determinadas pela ANOVA one-way e pós-teste de Tukey.

4.8.4 MMP-2 e TIMP-2

Os níveis de expressão desta metaloproteinase (MMP-2) de matriz não apresentaram diferença significativa entre os grupos estudados. Em relação à expressão proteica do inibidor de metaloproteinases (TIMP-2) no homogenato da aorta, não foi observada diferença estatística entre os grupos.

Figura 23 – Níveis das proteínas MMP-2 e TIMP-2 em homogenato de aorta



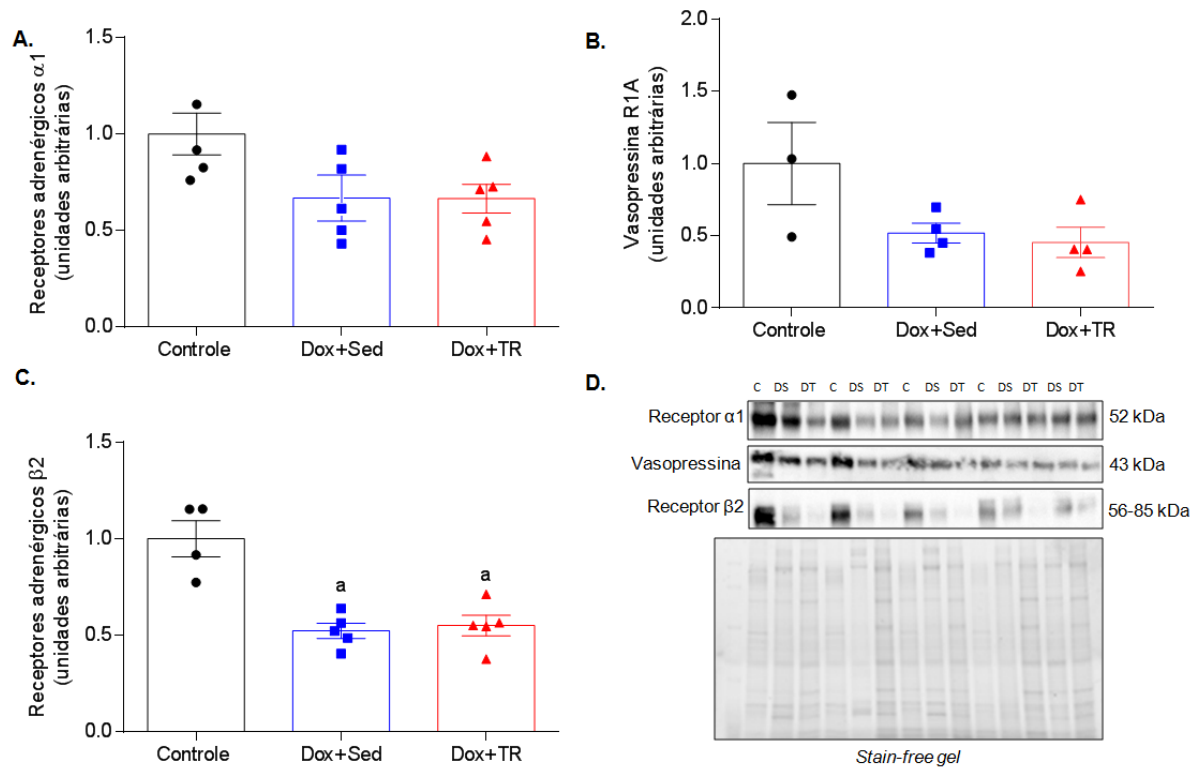
Legenda: Dox, doxorubicina; Sed, sedentário; TR, treinamento resistido (N=3-5).

Nota: Valores apresentados como média ± EPM. Diferenças significativas ($P \leq 0,05$) comparadas com: a \neq Controle, determinadas pela ANOVA one-way e pós-teste de Tukey.

4.8.5 Receptor 1A de Vasopressina e receptores adrenérgicos $\alpha 1$ e $\beta 2$

Nos resultados, pode-se observar que houve uma redução significativa na expressão do receptor beta2 adrenérgico em ambos os grupos Dox em comparação ao Controle. Com relação ao receptor alfa1 adrenérgico e ao receptor de vasopressina 1A, não houve diferença significativa entre grupo controle e os grupos DOX.

Figura 24 – Níveis dos receptores 1A de vasopressina e adrenérgicos $\alpha 1$ e $\beta 2$ em homogenato de aorta



Legenda: Dox, doxorubicina; Sed, sedentário; TR, treinamento resistido (N=3-5).

Nota: Valores apresentados como média \pm EPM (n= 4/4/5). Diferenças significativas ($P \leq 0,05$) comparadas com: a \neq Controle, determinadas pela ANOVA one-way e pós-teste de Tukey.

5 DISCUSSÃO

Apesar de amplamente utilizada no tratamento de neoplasias a Dox é conhecida por causar danos no sistema cardiovascular induzindo insuficiência cardíaca (Zhang, Liu *et al.* 2012). Alternativamente, o exercício físico exerce um efeito protetor sobre o sistema cardiovascular. Contudo, a maior parte dos estudos é voltada para o efeito cardioprotetor do exercício aeróbio (Chicco, Hydock *et al.* 2006). Portanto, a presente tese teve como objetivo investigar os efeitos do TR sobre a morfofuncionalidade cardíaca e a reatividade vascular em modelo experimental de toxicidade cardiovascular induzida por Dox. Os principais achados foram que a realização de um programa de TR de escalada, de intensidade progressiva (moderada a alta) durante 8 semanas, ocorrendo concomitantemente com a administração intraperitoneal de Dox durante os dez primeiros dias, atenuou a mortalidade, recuperou a massa corporal inicial, promoveu aumentos expressivos na força muscular e na enzima antioxidante GPx, preservou a função e morfologia cardíaca e a ultraestrutura dos cardiomiócitos e conservou a resposta vasodilatadora endotélio-dependente. No entanto, é importante ressaltar, que não foram encontrados efeitos positivos do TR entres os biomarcadores de dano oxidativo e na expressão de proteínas envolvidas em diferentes vias de sinalização cardíaca e vascular.

No presente estudo, o TR foi iniciado junto com a administração de Dox sugerindo que o mesmo possa atenuar a progressão das alterações deletérias cardiovasculares. A maior parte dos estudos realizou o treinamento, seja aeróbio ou resistido, antes da administração de Dox, sugerindo um papel profilático em que um melhor condicionamento físico pudesse prevenir os efeitos deletérios da Dox. Um aspecto importante acerca do exercício como intervenção cardioprotetora, é o que o mesmo parece não afetar a eficácia antineoplásica da Dox (Sturgeon, Schadler *et al.* 2014). Nossos resultados sugerem que o TR possa constituir uma relevante estratégia para preservação de massa e força muscular.

No estudo de Pfannenstiel e Hayward (2018) o TR atenuou o prejuízo no inotropismo e lusitropismo cardíaco nos animais tratados com Dox. O relaxamento cardíaco é afetado pela diminuição da recaptção de cálcio pela redução da atividade e da expressão da Ca_2+ ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA) (Zhang, Chen *et al.* 2014), assim como pelo remodelamento cardíaco adverso, caracterizado por um aumento do depósito de colágeno. Observamos, no presente estudo, que o TR reduziu significativamente a quantidade de fibrose no VE em relação ao grupo que permaneceu sedentário. Além disso, o remodelamento

fibrótico pode alterar diretamente o processo coordenado de excitação-contração, resultando em disfunção sistólica e diastólica e possibilitando ao desenvolvimento de arritmias (Kong, Christia *et al.* 2014). Vários mecanismos fisiopatológicos podem desencadear a resposta fibrótica, e na insuficiência cardíaca causada pela Dox, o aumento do estresse oxidativo parece ser o mecanismo mais plausível. Além disso, a produção de EROs desencadeia alterações nas membranas dos cardiomiócitos e das organelas intracelulares podendo ser oxidadas levando a formação de aldeídos tóxicos, sendo a peroxidação lipídica um marcador conhecido de estresse oxidativo, promovendo dano ao funcionamento da célula (Cipak Gasparovic, Zarkovic *et al.* 2017).

A literatura aponta que a administração de Dox resulte em um aumento do estresse oxidativo e que isto, inclusive, esteja envolvido no cerne da cardiotoxicidade (Minotti, Menna *et al.* 2004, Hassan, El-Beshbishy *et al.* 2014) No entanto, os resultados do nosso estudo acerca dos biomarcadores de estresse oxidativo não foram os esperados. Observamos um aumento do dano nitrosativo e de peroxidação lipídica em homogenato de VE do grupo Dox+TR, e um menor dano oxidativo proteico no grupo Dox+Sed em comparação ao controle. A atividade da enzima antioxidante GPx esteve significativamente aumentada no grupo TR em relação aos animais sedentários. Em comparação aos demais estudos publicados acerca do assunto, Feitosa *et al.* (2021) evidenciaram uma menor produção de $O_2^{\cdot-}$ pelo miocárdio em animais Dox treinados e, Pfannenstiel e Hayward (2018) não foram observaram diferenças significativas na análise de peroxidação lipídica entre os grupos. Podemos hipotetizar que os resultados do presente estudo sejam decorrentes da maior demanda energética miocárdica induzida pelo exercício físico. Como o coração é um órgão altamente oxidativo, o aumento do débito cardíaco causado pelas sessões de exercício pode resultar em adaptações metabólicas, incluindo um aumento no tamanho e número de mitocôndrias. De fato, a análise ultraestrutural sugere que os animais do grupo Dox+TR possuam um maior número de mitocôndrias que o grupo controle e as mitocôndrias possuem um aspecto mais arredondado, sugestivo de metabolismo lipídico aumentado. Como as mitocôndrias estão envolvidas na geração de EROs, talvez possam estar relacionadas aos achados que encontramos relacionados ao dano oxidativo. O aumento da atividade da GPx possa ser uma adaptação a essa hipotética produção aumentada de EROs. Ainda, não é possível excluir que, em algum momento (particularmente durante a administração da Dox), o estresse oxidativo no grupo Dox+Sed estivesse aumentado e que possa ter contribuído para a cardiotoxicidade, mas que não se perpetuou pelas oito semanas experimentais e não foi detectado na eutanásia.

Em relação à síntese proteica promovida pela cascata Akt-mTOR, a Dox aumenta a atividade de fosfatases possibilitando desfosforilação da Akt. No estudo de Feitosa et.al (2021) o TR proporcionou o aumento da fosforilação da Akt que é uma proteína envolvida em vários processos celulares, como proliferação e apoptose. O treinamento físico, no coração, vem demonstrando aumentar a fosforilação da Akt, que pode ser ativada por estímulos mecânicos, contribuindo para a preservação da função contrátil (Condorelli, Drusco *et al.* 2002, Ceci, Ross *et al.* 2004). A via de sinalização mTOR possui um papel importante como reguladora da síntese proteica e da regeneração do tecido muscular, sendo um dos seus principais mecanismos de ativação o TR. Quando ativada, ocorre a fosforilação nos alvos relacionadas ao aumento da síntese proteica (Figueiredo and Markworth 2015). No presente estudo, o TR manteve os níveis da mTOR diminuídos igualando ao sedentário, o oposto foi observado por Lim *et al.*, (2017) que avaliou o TR na ativação das células satélites e dos sinais anabólicos a nível molecular, que resultou num aumento na expressão da mTOR (Lim, Luu *et al.* 2017). Vale ressaltar, que os modelos analisados são diferentes, até onde sabemos ainda não tem na literatura o modelo experimental de TR avaliando esta proteína.

A ERK também é uma proteína quinase que desempenha um papel na sobrevivência e crescimento celular. Ao observar nossos resultados em relação a expressão da ERK, não encontramos diferenças na razão da expressão, porém, quando analisados separadamente, tanto os níveis totais e quanto os da proteína fosforilada estavam diminuídos nos grupos Dox em relação ao controle, indicando que o TR não resultou na indução de hipertrofia. Contudo, até onde se sabe, não existe um consenso se a hipertrofia induzida pela ERK seria fisiológica ou patológica.

Processos patológicos associados ao aumento do estresse oxidativo induzido por quimioterápico, particularmente a Dox, estão bem definidos na literatura. O dano oxidativo na função vascular parece estar correlacionado com a inibição da NOS, que por sua vez pode reduzir a resposta vasodilatadora em modelo experimental quando submetidos a uma única sessão de exercício físico (Jen, Chan *et al.* 2002, Tanaka, Bechara *et al.* 2015). Ghisi et al, 2010, observou que um dos principais mecanismos pelos quais o exercício físico promove uma melhora na resposta a agentes vasodilatadores é mediado pelo aumento da atividade ou expressão da NOS (Ghisi, Durieux *et al.* 2010). Assim, nosso estudo corrobora que o papel do exercício físico, mesmo que seja o TR, propicia em animais aumento de fatores vasodilatadores, como o NO, proporcionando uma proteção no endotélio vascular. Assim, nossos dados mostram que a ACh provocou uma resposta vasodilatadora dose-dependente aumentada no LAM isolado de animais do grupo Dox+TR em relação ao Dox+Sed. Em todos

os grupos analisados, não foi observado diferença na resposta vasodilatadora independente de endotélio promovido pela NG, mostrando não ter alteração da responsividade do músculo liso. Com relação a resposta vasoconstritora da NE, os grupos tratados com Dox obtiveram uma redução da responsividade vascular, destacamos que o TR atuou contra a vasoconstrição induzida pela NE. Ao analisarmos a reatividade vascular, os dados indicam que o TR possui um importante papel ao proteger a função endotelial dos danos causados pela Dox.

O aumento da biodisponibilidade do NO representa um equilíbrio entre a produção pela eNOS e a redução para $O_2^{\bullet-}$ (Jordão, Fernandes *et al.* 2017). No nosso estudo, demonstramos que a expressão da eNOS não foi alterada entre os grupos analisados na AA. Os mecanismos de modulação da eNOS no endotélio vascular ainda não estão elucidados, o aumento da sua expressão pode estar atribuído a outros mecanismos. Sendo assim, analisamos a expressão da NOX2 e NOX4 que são isoformas da NADPH oxidase, conhecida por produzir superóxido no sistema vascular (Griendling, Sorescu *et al.* 2000). A NOX2 também é chamada de gp91phox no qual é expressa no sistema vascular, principalmente no endotélio e está associada à inflamação vascular (Lassègue, San Martín *et al.* 2012, Forrester, Booz *et al.* 2018). No estudo De Falco *et al.*, 2016 o inibidor de NOX2 pode ser capaz de reduzir a toxicidade cardíaca induzida pela Dox (De Falco, Carnevale *et al.* 2016). Em nosso estudo, não observamos diferença na expressão da NOX2, sugerindo que esta subunidade catalítica não desempenha um papel significativo no aumento da geração de EROs induzido pelo tratamento com Dox. Já a NOX4 é uma molécula sinalizadora importante em processos fisiológicos, pois produz principalmente H_2O_2 , sendo expressa principalmente no músculo liso vascular. O papel fisiológico da NOX4 ainda não é claro por apresentar uma diferença em relação as outras isoformas de NADPH oxidase, por participar de efeitos potencialmente benéficos no sistema cardiovascular (Ray, Murdoch *et al.* 2011, Touyz and Montezano 2012). Com relação a NOX4, observamos uma redução na expressão na AA nos grupos submetidos à administração da Dox.

Contudo, a função de contração e relaxamento das artérias está associada a um equilíbrio dos componentes da túnica média que é constituída por matriz extracelular em fibras musculares lisas, colágenos e fibras elásticas (Tsamis, Krawiec *et al.* 2013). Nosso grupo observou uma deposição excessiva de colágeno na túnica média no grupo Dox, alterando as funções de contratilidade e de elasticidade (dados não publicados). A vasopressina também possui papel importante na contração muscular, sendo um hormônio antidiurético produzido por neurônios magnos celulares localizados nos núcleos paraventricular e supraóptico do hipotálamo com projeções celulares na hipófise posterior,

local onde a vasopressina fica armazenada antes de sua liberação (Meyer-Lindenberg, Domes *et al.* 2011). A vasopressina apresenta ser mais potente quando comparado a outros vasoconstritores como a noradrenalina e a fenilefrina, que ativam receptores adrenérgicos. Na insuficiência cardíaca, alguns sistemas neuro-hormonais como: vasopressina, sistema nervoso simpático, sistema renina-angiotensina- aldosterona, endotelina e citocinas são ativados para manter a homeostase do organismo, incluindo a pressão arterial. Porém, a hiperativação desses sistemas pode levar a um aumento da pré-carga cardíaca através da retenção de água e sódio, vasoconstrição periférica, redução do fluxo sanguíneo renal e remodelamento cardíaco. Com isso, ocorre um ciclo vicioso que agrava a insuficiência cardíaca (Brozena and Jessup 2003).

Em relação aos receptores envolvidos na vasoconstrição na musculatura lisa da AA, observamos que não houve diferença na expressão proteica do receptor vasopressina R1A e também do receptor adrenérgico α_1 , no entanto, houve uma redução na expressão do receptor β_2 . O músculo liso vascular possui, fisiologicamente, predomínio do subtipo de receptor adrenérgico α_1 , quando comparado ao receptor adrenérgico β_2 . Receptores alfa e β expressos por células endoteliais são mediadores da vasodilatação por meio da liberação de NO, via ativação da eNOS (Vanhoutte 2001) Cabe ressaltar que a vasoconstrição decorrente da ativação do receptor α_1 é contrabalanceada por uma vasodilatação secundária à ativação de receptores β_2 . O presente estudo demonstra que o TR não foi capaz de atenuar o possível remodelamento do músculo liso vascular, podendo alterar as funções de contração e de elasticidade do músculo liso vascular em ratos tratados com Dox. Ao analisarmos a expressão da MMP-2 e seu inibidor TIMP2 não observamos diferenças significativas. Kopaliani e colaboradores (2014) verificaram que o aumento na expressão da proteína MMP-2 em células endoteliais e musculares lisas na aorta de ratos contribuem para o aumento da rigidez arterial. O endotélio pode desempenhar um papel primordial na ativação da MMP-2. Esses resultados podem levar a novas estratégias de inibição da expressão e atividade de MMP-2 em diferentes tipos de células da parede aórtica. (Kopaliani, Martin *et al.* 2014)

CONCLUSÃO

O TR se mostrou uma intervenção eficaz para atenuar a mortalidade e os danos ocasionados pela Dox sobre a estrutura e função ventricular esquerda. Ainda, resultou em melhoria da vasodilatação endotélio-dependente, mas não atenuou a hiporresponsividade a estímulos contráteis. No entanto, os possíveis mediadores celulares e moleculares envolvidos ainda são desconhecidos.

REFERÊNCIAS

- Adao, R., G. de Keulenaer, A. Leite-Moreira and C. Bras-Silva (2013). "Cardiotoxicity associated with cancer therapy: pathophysiology and prevention strategies." Rev Port Cardiol **32**(5): 395-409.
- Ahles, C. P., H. Singh, W. Joo, Y. Lee, L. C. Lee, W. Colazas, R. A. Pierce, A. Prakash, S. V. Jaque and K. D. Sumida (2013). "High volumes of resistance exercise are not required for greater bone mineral density during growth." Med Sci Sports Exerc **45**(1): 36-42.
- Akolkar, G., D. da Silva Dias, P. Ayyappan, A. K. Bagchi, D. S. Jassal, V. M. C. Salemi, M. C. Irigoyen, K. De Angelis and P. K. Singal (2017). "Vitamin C mitigates oxidative/nitrosative stress and inflammation in doxorubicin-induced cardiomyopathy." Am J Physiol Heart Circ Physiol **313**(4): H795-h809.
- Bartlett, J. J., P. C. Trivedi and T. Pulinilkunnil (2017). "Autophagic dysregulation in doxorubicin cardiomyopathy." J Mol Cell Cardiol **104**: 1-8.
- Brozena, S. C. and M. Jessup (2003). "The new staging system for heart failure. What every primary care physician should know." Geriatrics **58**(6): 31-36; quiz 38.
- Campbell, K. L., K. M. Winters-Stone, J. Wiskemann, A. M. May, A. L. Schwartz, K. S. Courneya, D. S. Zucker, C. E. Matthews, J. A. Ligibel, L. H. Gerber, G. S. Morris, A. V. Patel, T. F. Hue, F. M. Perna and K. H. Schmitz (2019). "Exercise Guidelines for Cancer Survivors: Consensus Statement from International Multidisciplinary Roundtable." Med Sci Sports Exerc **51**(11): 2375-2390.
- Cassilhas, R. C., K. S. Lee, D. P. Venâncio, M. G. Oliveira, S. Tufik and M. T. de Mello (2012). "Resistance exercise improves hippocampus-dependent memory." Braz J Med Biol Res **45**(12): 1215-1220.
- Cassilhas, R. C., I. T. Reis, D. Venâncio, J. Fernandes, S. Tufik and M. T. d. J. M. R. d. E. F. Mello (2013). "Animal model for progressive resistance exercise: a detailed description of model and its implications for basic research in exercise." **19**: 178-184.
- Ceci, M., J. Ross, Jr. and G. Condorelli (2004). "Molecular determinants of the physiological adaptation to stress in the cardiomyocyte: a focus on AKT." J Mol Cell Cardiol **37**(5): 905-912.
- Chen, J. J., P. T. Wu, H. R. Middlekauff and K. L. Nguyen (2017). "Aerobic exercise in anthracycline-induced cardiotoxicity: a systematic review of current evidence and future directions." Am J Physiol Heart Circ Physiol **312**(2): H213-h222.
- Chicco, A. J., D. S. Hydock, C. M. Schneider and R. Hayward (2006). "Low-intensity exercise training during doxorubicin treatment protects against cardiotoxicity." J Appl Physiol (1985) **100**(2): 519-527.
- Cipak Gasparovic, A., N. Zarkovic, K. Zarkovic, K. Semen, D. Kaminsky, O. Yelisyeyeva and S. P. Bottari (2017). "Biomarkers of oxidative and nitro-oxidative stress: conventional and novel approaches." Br J Pharmacol **174**(12): 1771-1783.
- Condorelli, G., A. Drusco, G. Stassi, A. Bellacosa, R. Roncarati, G. Iaccarino, M. A. Russo, Y. Gu, N. Dalton, C. Chung, M. V. Latronico, C. Napoli, J. Sadoshima, C. M. Croce and J.

Ross, Jr. (2002). "Akt induces enhanced myocardial contractility and cell size in vivo in transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(19): 12333-12338.

De Falco, E., R. Carnevale, F. Pagano, I. Chimenti, L. Fianchini, A. Bordin, C. Siciliano, R. Monticolo, F. Equitani, A. Carrizzo, M. Peruzzi, C. Vecchione, S. Rubattu, S. Sciarretta and G. Frati (2016). "Role of NOX2 in mediating doxorubicin-induced senescence in human endothelial progenitor cells." Mech Ageing Dev **159**: 37-43.

Feitosa, L. A. S., J. D. S. Carvalho, C. O. Dantas, D. S. de Souza, C. M. L. de Vasconcelos, R. Miguel-Dos-Santos, S. Lauton-Santos, L. J. Quíntans-Júnior, M. R. V. Santos, V. J. de Santana-Filho and A. S. Barreto (2021). "Resistance training improves cardiac function and cardiovascular autonomic control in doxorubicin-induced cardiotoxicity." Cardiovasc Toxicol **21**(5): 365-374.

Figueiredo, V. C. and J. F. Markworth (2015). "Mechanisms of protein synthesis activation following exercise: new pieces to the increasingly complex puzzle." J Physiol **593**(21): 4693-4695.

Forrester, S. J., G. W. Booz, C. D. Sigmund, T. M. Coffman, T. Kawai, V. Rizzo, R. Scalia and S. Eguchi (2018). "Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology." Physiol Rev **98**(3): 1627-1738.

Gallo, S., A. Vitacolonna, A. Bonzano, P. Comoglio and T. Crepaldi (2019). "ERK: A Key Player in the Pathophysiology of Cardiac Hypertrophy." Int J Mol Sci **20**(9).

Ghignatti, P., L. J. Nogueira, A. M. Lehen and N. M. Leguisamo (2021). "Cardioprotective effects of exercise training on doxorubicin-induced cardiomyopathy: a systematic review with meta-analysis of preclinical studies." Sci Rep **11**(1): 6330.

Ghisi, G. L. d. M., A. Durieux, R. Pinho and M. J. A. b. d. c. Benetti (2010). "Physical exercise and endothelial dysfunction." **95**: e130-e137.

Griendling, K. K., D. Sorescu and M. Ushio-Fukai (2000). "NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease." Circ Res **86**(5): 494-501.

Hall, S. E., A. J. Smuder and R. Hayward (2019). "Effects of Calorie Restriction and Voluntary Exercise on Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity." Integr Cancer Ther **18**: 1534735419843999.

Hang, P., J. Zhao, L. Sun, M. Li, Y. Han, Z. Du and Y. Li (2017). "Brain-derived neurotrophic factor attenuates doxorubicin-induced cardiac dysfunction through activating Akt signalling in rats." J Cell Mol Med **21**(4): 685-696.

Hassan, M. H., H. A. El-Beshbishy, H. Aly, S. M. Attia, S. A. Bahashwan and M. M. Ghobara (2014). "Modulatory effects of meloxicam on cardiotoxicity and antitumor activity of doxorubicin in mice." Cancer Chemother Pharmacol **74**(3): 559-569.

He, L., F. Liu and J. Li (2021). "Mitochondrial Sirtuins and Doxorubicin-induced Cardiotoxicity." Cardiovasc Toxicol **21**(3): 179-191.

Idorn, M. and P. Thor Straten (2017). "Exercise and cancer: from "healthy" to "therapeutic"?" Cancer Immunol Immunother **66**(5): 667-671.

- Jen, C. J., H. P. Chan and H. I. Chen (2002). "Acute exercise enhances vasorelaxation by modulating endothelial calcium signaling in rat aortas." Am J Physiol Heart Circ Physiol **282**(3): H977-982.
- Johnson, L. R., J. L. Parker and M. H. Laughlin (2000). "Chronic exercise training improves ACh-induced vasorelaxation in pulmonary arteries of pigs." J Appl Physiol (1985) **88**(2): 443-451.
- Jordão, C. P., T. Fernandes, L. Y. Tanaka, L. R. G. Bechara, L. G. O. de Sousa, E. M. Oliveira and P. R. Ramires (2017). "Aerobic Swim Training Restores Aortic Endothelial Function by Decreasing Superoxide Levels in Spontaneously Hypertensive Rats." Clinics (Sao Paulo) **72**(5): 310-316.
- Kalil Filho, R., L. A. Hajjar, F. Bacal, P. M. Hoff, P. Diz Mdel, F. R. Galas, J. T. Fukushima, J. P. Almeida, R. E. Nakamura, T. R. Trielli, C. S. Bittar, M. H. Santos, F. G. Galdeano, J. O. Auler Junior, A. A. Silvestrini, A. Alencar, A. C. Mota, C. A. Gusmao, D. R. Almeida, C. M. Simoes, E. A. Bocchi, E. M. Lima, F. Fernandes, F. S. Silveira, F. Vilas-Boas, L. Beck da Silva Neto, L. E. Rohde, M. W. Montera, M. Barbosa, M. S. Mano, R. S. Riechelmann, R. J. Arai, S. M. Martins, S. M. Ferreira and V. Santos (2011). "[I Brazilian Guideline for Cardio-Oncology from Sociedade Brasileira de Cardiologia]." Arq Bras Cardiol **96**(2 Suppl 1): 1-52.
- Kim, Y. A., H. Cho, N. Lee, S. Y. Jung, S. H. Sim, I. H. Park, S. Lee, E. S. Lee and H. J. Kim (2018). "Doxorubicin-induced heart failure in cancer patients: A cohort study based on the Korean National Health Insurance Database." Cancer Med **7**(12): 6084-6092.
- Kong, P., P. Christia and N. G. Frangogiannis (2014). "The pathogenesis of cardiac fibrosis." Cell Mol Life Sci **71**(4): 549-574.
- Konior, A., A. Schramm, M. Czesnikiewicz-Guzik and T. J. Guzik (2014). "NADPH oxidases in vascular pathology." Antioxid Redox Signal **20**(17): 2794-2814.
- Kopaliani, I., M. Martin, B. Zatschler, K. Bortlik, B. Müller and A. Deussen (2014). "Cell-specific and endothelium-dependent regulations of matrix metalloproteinase-2 in rat aorta." Basic Res Cardiol **109**(4): 419.
- Landmesser, U., S. Dikalov, S. R. Price, L. McCann, T. Fukai, S. M. Holland, W. E. Mitch and D. G. Harrison (2003). "Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension." J Clin Invest **111**(8): 1201-1209.
- Lassègue, B., A. San Martín and K. K. Griendling (2012). "Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system." Circ Res **110**(10): 1364-1390.
- Li, Q., T. Qin, Z. Bi, H. Hong, L. Ding, J. Chen, W. Wu, X. Lin, W. Fu, F. Zheng, Y. Yao, M. L. Luo, P. E. Saw, G. M. Wulf, X. Xu, E. Song, H. Yao and H. Hu (2020). "Rac1 activates non-oxidative pentose phosphate pathway to induce chemoresistance of breast cancer." Nat Commun **11**(1): 1456.
- Li, X., J. Gu, Y. Zhang, S. Feng, X. Huang, Y. Jiang, Y. Xia, Y. Liu and X. Yang (2019). "L-arginine alleviates doxorubicin-induced endothelium-dependent dysfunction by promoting nitric oxide generation and inhibiting apoptosis." Toxicology **423**: 105-111.
- Lim, C. H., T. S. Luu, L. Q. Phoung, T. S. Jeong and C. K. Kim (2017). "Satellite cell activation and mTOR signaling pathway response to resistance and combined exercise in elite weight lifters." Eur J Appl Physiol **117**(11): 2355-2363.

- Luu, A. Z., B. Chowdhury, M. Al-Omran, H. Teoh, D. A. Hess and S. Verma (2018). "Role of Endothelium in Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy." JACC Basic Transl Sci **3**(6): 861-870.
- Lv, H., R. Tan, J. Liao, Z. Hao, X. Yang, Y. Liu and Y. Xia (2020). "Doxorubicin contributes to thrombus formation and vascular injury by interfering with platelet function." Am J Physiol Heart Circ Physiol **319**(1): H133-h143.
- Mancilla, T. R., B. Iskra and G. J. Aune (2019). "Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy in Children." Compr Physiol **9**(3): 905-931.
- Matsuura, C., T. M. Brunini, L. C. Carvalho, A. C. Resende, J. J. Carvalho, J. P. de Castro and A. C. Mendes-Ribeiro (2010). "Exercise training in doxorubicin-induced heart failure: effects on the L-arginine-NO pathway and vascular reactivity." J Am Soc Hypertens **4**(1): 7-13.
- McGowan, J. V., R. Chung, A. Maulik, I. Piotrowska, J. M. Walker and D. M. Yellon (2017). "Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity." Cardiovasc Drugs Ther **31**(1): 63-75.
- Meyer-Lindenberg, A., G. Domes, P. Kirsch and M. Heinrichs (2011). "Oxytocin and vasopressin in the human brain: social neuropeptides for translational medicine." Nat Rev Neurosci **12**(9): 524-538.
- Minotti, G., P. Menna, E. Salvatorelli, G. Cairo and L. Gianni (2004). "Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity." Pharmacol Rev **56**(2): 185-229.
- Mitry, M. A. and J. G. Edwards (2016). "Doxorubicin induced heart failure: Phenotype and molecular mechanisms." Int J Cardiol Heart Vasc **10**: 17-24.
- Naaktgeboren, W. R., D. Binyam, M. M. Stuiver, N. K. Aaronson, A. J. Teske, W. H. van Harten, W. G. Groen and A. M. May (2021). "Efficacy of Physical Exercise to Offset Anthracycline-Induced Cardiotoxicity: A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical and Preclinical Studies." J Am Heart Assoc **10**(17): e021580.
- Narezkina, A. and K. Nasim (2019). "Anthracycline Cardiotoxicity." Circ Heart Fail **12**(3): e005910.
- Pfannenstiel, K. and R. Hayward (2018). "Effects of Resistance Exercise Training on Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity." J Cardiovasc Pharmacol **71**(6): 332-339.
- Polegato, B. F., M. F. Minicucci, P. S. Azevedo, R. F. Carvalho, F. Chiuso-Minicucci, E. J. Pereira, S. A. Paiva, L. A. Zornoff, M. P. Okoshi, B. B. Matsubara and L. S. Matsubara (2015). "Acute doxorubicin-induced cardiotoxicity is associated with matrix metalloproteinase-2 alterations in rats." Cell Physiol Biochem **35**(5): 1924-1933.
- Rabinovich-Nikitin, I., M. Love and L. A. Kirshenbaum (2021). "Inhibition of MMP prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity by attenuating cardiac intracellular and extracellular matrix remodelling." Cardiovasc Res **117**(1): 11-12.
- Rawat, P. S., A. Jaiswal, A. Khurana, J. S. Bhatti and U. Navik (2021). "Doxorubicin-induced cardiotoxicity: An update on the molecular mechanism and novel therapeutic strategies for effective management." Biomedicine & Pharmacotherapy **139**: 111708.
- Ray, R., C. E. Murdoch, M. Wang, C. X. Santos, M. Zhang, S. Alom-Ruiz, N. Anilkumar, A. Ouattara, A. C. Cave, S. J. Walker, D. J. Grieve, R. L. Charles, P. Eaton, A. C. Brewer and A. M. Shah (2011). "Endothelial Nox4 NADPH oxidase enhances vasodilatation and reduces blood pressure in vivo." Arterioscler Thromb Vasc Biol **31**(6): 1368-1376.

Ray, R. and A. M. Shah (2005). "NADPH oxidase and endothelial cell function." Clin Sci (Lond) **109**(3): 217-226.

Sanches, I., F. Conti, M. Sartori, M. Irigoyen and K. J. I. j. o. s. m. De Angelis (2014). "Standardization of resistance exercise training: effects in diabetic ovariectomized rats." **35**(04): 323-329.

Saúde, M. d. (2019). Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, INCA. Scarabelli, T., A. Stephanou, N. Rayment, E. Pasini, L. Comini, S. Curello, R. Ferrari, R. Knight and D. Latchman (2001). "Apoptosis of endothelial cells precedes myocyte cell apoptosis in ischemia/reperfusion injury." Circulation **104**(3): 253-256.

Schmidt, T., B. Weisser, J. Dürkop, W. Jonat, M. Van Mackelenbergh, C. Röcken and C. Mundhenke (2015). "Comparing Endurance and Resistance Training with Standard Care during Chemotherapy for Patients with Primary Breast Cancer." Anticancer Res **35**(10): 5623-5629.

Schmitz, K. H., K. S. Courneya, C. Matthews, W. Demark-Wahnefried, D. A. Galvão, B. M. Pinto, M. L. Irwin, K. Y. Wolin, R. J. Segal, A. Lucia, C. M. Schneider, V. E. von Gruenigen and A. L. Schwartz (2010). "American College of Sports Medicine roundtable on exercise guidelines for cancer survivors." Med Sci Sports Exerc **42**(7): 1409-1426.

Seo, D. Y., S. R. Lee, N. Kim, K. S. Ko, B. D. Rhee and J. Han (2014). "Humanized animal exercise model for clinical implication." Pflugers Arch **466**(9): 1673-1687.

Sequeira, C. M., M. A. Martins, R. Alves, A. L. R. Nascimento, G. Botti, V. N. Rocha and C. Matsuura (2021). "Aerobic exercise training attenuates doxorubicin-induced ultrastructural changes in rat ventricular myocytes." Life Sci **264**: 118698.

Shiguemoto, G. E., J. Prestes, R. D. Leite, G. B. Pereira, C. L. Pontes, V. D'Ávila F, J. P. Botero, V. Baldissera, K. O. Nonaka, H. S. Selistre-de-Araújo and S. E. Perez (2012). "Effects of resistance training on matrix metalloproteinase-2 activity and biomechanical and physical properties of bone in ovariectomized and intact rats." Scand J Med Sci Sports **22**(5): 607-617.

Smuder, A. J., A. N. Kavazis, K. Min and S. K. Powers (2013). "Doxorubicin-induced markers of myocardial autophagic signaling in sedentary and exercise trained animals." J Appl Physiol (1985) **115**(2): 176-185.

Soultati, A., G. Mountzios, C. Avgerinou, G. Papaxoinis, D. Pectasides, M. A. Dimopoulos and C. Papadimitriou (2012). "Endothelial vascular toxicity from chemotherapeutic agents: preclinical evidence and clinical implications." Cancer Treat Rev **38**(5): 473-483.

Sturgeon, K., K. Schadler, G. Muthukumar, D. Ding, A. Bajulaiye, N. J. Thomas, V. Ferrari, S. Ryeom and J. R. Libonati (2014). "Concomitant low-dose doxorubicin treatment and exercise." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **307**(6): R685-692.

Tanaka, L. Y., L. R. Bechara, A. M. dos Santos, C. P. Jordão, L. G. de Sousa, T. Bartholomeu, L. I. Ventura, F. R. Laurindo and P. R. Ramires (2015). "Exercise improves endothelial function: a local analysis of production of nitric oxide and reactive oxygen species." Nitric Oxide **45**: 7-14.

Touyz, R. M. and A. C. Montezano (2012). "Vascular Nox4: a multifarious NADPH oxidase." Circ Res **110**(9): 1159-1161.

- Tsamis, A., J. T. Krawiec and D. A. Vorp (2013). "Elastin and collagen fibre microstructure of the human aorta in ageing and disease: a review." J R Soc Interface **10**(83): 20121004.
- Vanhoutte, P. M. (2001). "Endothelial adrenoceptors." J Cardiovasc Pharmacol **38**(5): 796-808.
- Varghese, S. S., W. J. Johnston, C. R. Eekhoudt, M. R. Keats, D. S. Jassal and S. A. Grandy (2021). "Exercise to Reduce Anthracycline-Mediated Cardiovascular Complications in Breast Cancer Survivors." Curr Oncol **28**(5): 4139-4156.
- Vejpongsa, P. and E. T. Yeh (2014). "Topoisomerase 2beta: a promising molecular target for primary prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity." Clin Pharmacol Ther **95**(1): 45-52.
- Winters-Stone, K. M., J. Dobek, J. A. Bennett, L. M. Nail, M. C. Leo and A. Schwartz (2012). "The effect of resistance training on muscle strength and physical function in older, postmenopausal breast cancer survivors: a randomized controlled trial." J Cancer Surviv **6**(2): 189-199.
- Wojtacki, J., E. Lewicka-Nowak and K. Leśniewski-Kmak (2000). "Anthracycline-induced cardiotoxicity: clinical course, risk factors, pathogenesis, detection and prevention--review of the literature." Med Sci Monit **6**(2): 411-420.
- Zamorano, J. L., P. Lancellotti, D. Rodriguez Muñoz, V. Aboyans, R. Asteggiano, M. Galderisi, G. Habib, D. J. Lenihan, G. Y. H. Lip, A. R. Lyon, T. Lopez Fernandez, D. Mohty, M. F. Piepoli, J. Tamargo, A. Torbicki and T. M. Suter (2016). "2016 ESC Position Paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of the ESC Committee for Practice Guidelines: The Task Force for cancer treatments and cardiovascular toxicity of the European Society of Cardiology (ESC)." Eur Heart J **37**(36): 2768-2801.
- Zhang, S., X. Liu, T. Bawa-Khalfe, L. S. Lu, Y. L. Lyu, L. F. Liu and E. T. Yeh (2012). "Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity." Nat Med **18**(11): 1639-1642.
- Zhang, X., C. Hu, C. Y. Kong, P. Song, H. M. Wu, S. C. Xu, Y. P. Yuan, W. Deng, Z. G. Ma and Q. Z. Tang (2020). "FNDC5 alleviates oxidative stress and cardiomyocyte apoptosis in doxorubicin-induced cardiotoxicity via activating AKT." Cell Death Differ **27**(2): 540-555.
- Zhang, Y., Y. Chen, M. Zhang, Y. Tang, Y. Xie, X. Huang and Y. Li (2014). "Doxorubicin induces sarcoplasmic reticulum calcium regulation dysfunction via the decrease of SERCA2 and phospholamban expressions in rats." Cell Biochem Biophys **70**(3): 1791-1798.