

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Camila Salata

Ação Concomitante da Irradiação e Quimioterapia no Coração de Ratas Wistar

Rio de Janeiro 2013 Camila Salata

Ação Concomitante da Irradiação e Quimioterapia no Coração de Ratas Wistar

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo de Almeida

Rio de Janeiro 2013

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

S159 Salata, Camila. Ação concomitante da irradiação e quimioterapia no coração de ratas Wistar / Camila Salata. - 2013. 85 f. Orientador: Carlos Eduardo de Almeida. Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental. 1. Mamas - Câncer - Teses. 2. Quimioterapia - Efeitos adversos. 3. Radioterapia - Efeitos adversos. 4. Sistema renina-angiotensina - Teses. 5. Sistema renina-angiotensina - Efeitos de drogas. 5. Antineoplásicos - Efeitos adversos. 6. Remodelação ventricular - Efeitos de drogas. I. Almeida, Carlos Eduardo de. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título. CDU 618.19-006:616.12-008

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

Assinatura

Data

Camila Salata

Ação Concomitante da Irradiação e Quimioterapia no Coração de Ratas Wistar

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

Aprovada em 15 de Julho de 2013.

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Eduardo Veloso de Almeida

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Jorge José de Carvalho Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. André Luiz Mencalha Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Samara Cristina Ferreira Machado Instituto de Biologia Geral - UFF

Prof.^a Dra. Silvia Maria Velasques Instituto de Radioproteção e Dosimetria

> Rio de Janeiro 2013

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido, Marcus, por todos os conselhos e comentários inteligentes, e por nunca permitir que eu desanimasse;

Aos meus pais, Maria José e Ricardo, por apoiarem minhas escolhes, sempre;

Ao meu irmão André, por sempre me apresentar um ponto de vista diferente do meu;

Às minhas Tias Paula e Cláudia, e aos meus avós, Ana e Ênio, por estarem sempre tão presentes, apesar de morarem tão distante;

À minha nova amiga de infância, Cherley, por todos os momentos difíceis e divertidos que passamos juntas, nesses 4 anos, e certamente passaremos muitos outros nessa parceria que deu tão certo;

À amiga Claudinha, outro presente que ganhei no Doutorado, sempre bem humorada e com sábias sugestões, minha futura mestranda;

À minha querida amiga Camilla Com Calor Sampaio, foram muitas risadas desde quando entrei no LCR, e ela me recebeu tão bem;

À amiga Samara, que desde o início aceitou começar um trabalho de biologia com uma física, sem nunca contestar isso, e juntas publicamos, rimos, choramos e trabalhamos muito;

A todos do LCR que de alguma forma contribuíram para que este trabalho chegasse ao fim, especialmente a Vivi, muito prestativa, quebrando todos os galhos;

Aos alunos do LMMC, sempre dispostos a me ajudar, e ao Coordenador, Prof. Mandarim, que me auxiliou e apoiou durante esse período;

E ao meu querido orientador, Carlos Eduardo de Almeida, que sempre me apoiou, incentivou, e me deu a oportunidade de crescer.

RESUMO

SALATA, Camila. *Ação concomitante da irradiação e quimioterapia no coração de ratas Wistar*. 2013. 85f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

O Câncer de mama (CM) é hoje o tipo de câncer mais incidente entre as mulheres, com a estimativa de 53 mil novos casos para o ano de 2013, segundo o Instituno Nacional do Câncer (INCA). É considerada uma doença de bom prognóstico, principalmente quando diagnosticada na sua fase mais precoce. A evolução no diagnóstico, e nas técnicas de tratamento para o CM, que incluem a quimioterapia e/ou radioterapia, aumentaram a expectativa de sobrevida para este tipo de câncer. Uma das complicações tardias induzidas pelo tratamento desta doença é a cardiotoxicidade. O termo cardiotoxicidade abrange uma série de efeitos colaterais, que incluem arritmias, alterações na pressão arterial, isquemia do miocárdio, trombose ou insuficiência cardíaca. É, por isso, fundamental entender os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da toxicidade cardíaca para o sucesso do tratamento dos pacientes com CM. Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos cardíacos tardios induzidos pela irradiação e quimioterapia, simulando um tratamento para o CM, em ratas Wistar. Ratas Wistar, com aproximadamente 3 meses de idade, foram divididas em: grupo controle, grupo que recebeu quimioterapia + irradiação (TC+IR), e grupo que recebeu apenas irradiação (IR). A quimioterapia foi administrada em 4 ciclos, com intervalo de 1 semana entre eles. A irradiação na região do coração foi realizada em dose única, de 20Gy, em um campo de $2x2 \text{ cm}^2$. Os ratos foram submetidos à eutanásia 5 meses após o término dos tratamentos, para que os efeitos tardios pudessem ser avaliados. Vários estudos foram conduzidos: ecocardiografia para observar as alterações funcionais do coração; PCR em tempo real para detectar alterações no nível mRNA de procolágeno tipo I, TGF-β1, angiotensinogênio, renina, ECA, AT1, VEGF e razão Bax/;bcl2, no tecido do ventrículo esquerdo (VE); Além de ensaios histológicos para avaliar o aspecto do tecido cardíaco do VE. Os resultados obtidos indicam um processo de remodelamento cardíaco após os tratamentos para o CM. Sugere-se que este remodelamento inicie-se com a diminuição de vasos no VE, causada pelos tratamentos, conforme os resultados da estereologia e do PCR para VEGF. Em seguida mostrou-se hipertrofia dos cardiomiócitos, o aumento da expressão de procolágeno e TGF-\beta1 e de tecido conjuntivo neste tecido. E associado a estes resultados, mostrou-se a participação dos sistema renina angiotensina cardíaco neste processo de remodelamento. Porém, apesar de todas estas alterações terem ocorrido em ambos os grupos tratados, apenas o grupo que recebeu irradiação e quimioterapia concomitantemente apresentou alteração da função cardíaca, na ecocardiografia. Sugere-se, desta forma, que a associação destas terapias seja mais lesiva ao coração, do que a irradiação aplicada exclusivamente. Os objetivos do trabalho foram alcançados, e pode-se entender melhor as vias envolvidas na cardiotoxicidade. Este é um estudo inédito, o assunto abordado é recente, e de sumo importância para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento para o CM, onde sejam consideradas as complicações cardíacas tardias envolvidas.

Palavras-chave: Câncer de Mama. Cardiotoxicidade. Sistema Renina Angiotensina Cardíaco. Docetaxel. Radioterapia.

ABSTRACT

SALATA, Camila. *Concurrent Action of Irradiation and Chemotherapy at Wistar Rats Hearts.* 2013. 85f. Tese de Doutorado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Breast cancer (BC) is today the most frequent type of cancer among women, there were estimated 53 000 new cases for the year 2013, according to the National Cancer Institute (INCA). It is considered a disease of good prognosis, especially when diagnosed in early stages. The developments in the diagnosis, and treatment techniques for the BC, which include chemotherapy and/or radiotherapy, increased the survival rates for this type of cancer. One late complication induced by BC treatment is the cardiotoxicity. The cardiotoxicity term comprises different cardiotoxic side effects, which includes arrhythmia, blood pressure alterations, myocardial ischemia, thrombosis or congestive heart failure. It is, therefore, essential to understand the mechanisms involved in the development of cardiac toxicity for the successful treatment of patients with BC. This study aimed to evaluate the late cardiac effects induced by irradiation and chemotherapy, simulating a treatment for BC in Wistar rats. Wistar rats, about 3 months old, were divided into control group; a group receiving chemotherapy + irradiation (TC+IR), and a group that received only irradiation (IR). Chemotherapy was administered in 4 cycles, with an one week interval between them. The irradiation at the heart area was performed in a single dose of 20 Gy, and a field of $2x2 \text{ cm}^2$. The rats were euthanized 5 months after the end of treatments, so the late effects could be evaluated. Several studies were conducted: echocardiography to observe the heart functional changes, real-time PCR to detect alterations in mRNA level of procollagen type I, TGF-β1, angiotensinogen, renin, ACE, AT1, VEGF and Bax/bcl2 ratio, in the left ventricle (LV) tissue; The LV cardiac tissue was also evaluated by assays. The results indicate a process of cardiac remodeling after the BC. It is suggested that this remodeling starts with a reduction of the cardiac vessels, induced by treatments, according the results of stereology, and the PCR for VEGF. Then, it was showed a cardiomyocyte hypertrophy, an increased expression of TGF-\beta1 and procollagen, and increased connective tissue in the LV. Associated with these results, it was indicated the involvement of the cardiac renin-angiotensin system in the remodeling process. However, even though all these changes have occurred in both treated groups, only the group receiving concurrent radiation and chemotherapy had a decrease in the cardiac function, showed by echocardiography. It is suggested that the combination of these therapies to the heart is more detrimental than the irradiation applied alone. The aims of this work were achieved, and it is possible to better understand the pathways involved in cardiotoxicity. This is a novel study, the subject issue is recent, and of high impact in the development of new treatment strategies for BC where the involved cardiac complications are considered.

Key-words: Breast Cancer. Cardiotoxicity. Cardiac Renin-Angiotensin System. Docetaxel. Radiotherapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Fatores potencialmente cardiotóxicos envolvidos no tratamento do Câncer de Mama	20
Quadro 1 –	Distribuição dos animais, de acordo com o tratamento realizado	35
Figura 2 –	Animal do grupo TC+IR recebendo quimioterapia	36
Figura 3 –	Irradiação dos animais dos grupos TC+IR e IR	37
Figura 4 –	Fração de ejeção, obtida por ecocardiografia	49
Figura 5 –	Débito cardíaco, obtido por ecocardiografia	49
Figura 6 –	Acompanhamento das massas corporais dos animais	50
Figura 7 –	Massa do coração normalizada pelo comprimento da tíbia	51
Figura 8 –	Massa do ventrículo esquerdo (VE) normalizada pelo comprimento da tíbia	52
Figura 9 –	Diferença no nível de expressão de mRNA de TGF- β_1 no ventrículo esquerdo	53
Figura 10 –	Diferença no nível de expressão de mRNA de Procolágeno tipo I no ventrículo esquerdo	53
Figura 11 –	Diferença no nível de expressão de mRNA de Angiotensinogênio no ventrículo esquerdo	54
Figura 12 –	Diferença no nível de expressão de mRNA de Renina no ventrículo esquerdo	55
Figura 13 –	Diferença no nível de expressão de mRNA da enzima conversora de angiotensina (ECA) no ventrículo esquerdo	55
Figura 14 –	Diferença no nível de expressão de mRNA do receptor de angiotensina tipo 1 (AT_1) no ventrículo esquerdo	56
Figura 15 –	Diferença no nível de expressão de mRNA do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) no ventrículo esquerdo	57
Figura 16 –	Diferença no nível de expressão de mRNA da razão Bax/bcl2, no ventrículo esquerdo	58
Figura 17 –	Imagem obtida no programa STEPanizer, para a realização da contagem dos parâmetros estereológicos	59

Figura 18 –	Imagens obtidas por microscopia óptica, do tecido do VE dos animais, através da técnica de imunohistoquímica para anticorpo anti-CD31	60
Figura 19 –	Densidade de volume dos cardiomiócitos do VE dos animais	61
Figura 20 –	Área seccional média dos cardiomiócitos do VE dos animais	62
Figura 21 –	Densidade de comprimento dos microvasos intramiocárdicos do VE dos animais	63
Figura 22 –	Densidade volume dos microvasos intramiocárdicos do VE dos animais	63
Figura 23 –	Densidade volume dos microvasos intramiocárdicos por cardiomiócitos do VE dos animais	64
Figura 24 –	Densidade volume de Tecido Conjuntivo no VE dos animais	65
Figura 25 –	Imagem obtida por microscopia óptica de tecido do VE corado com a técnica de picrosirius red	66
Figura 26 –	Imagens obtidas por microscopia óptica, de vasos no tecido do VE corado com picrosirius red	67
Figura 27 –	Imagens obtidas, através de microscopia óptica com objetiva de 60x, do VE doa animais, corado com azul de toluidina	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CM –	Câncer de Mama
RT –	Radioterapia
DNA –	Ácido Desoxirribonucléico
QT –	Quimioterapia
FAC –	Fluorouracil, Adriamicina e Ciclofosfamida
CMF –	Ciclofosfamida, Metotrexato e Fluorouracil
US –	United States
AC –	Doxorrubicina e Ciclofosfamida
TC –	Docetaxel e Ciclofosfamida
FEVE –	Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo
NIH –	National Institutes of Health
IMC –	Índice de Massa Corporal
HER2 –	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
RIHD –	Doença Cardíaca Radioinduzida
Gy –	Gray
EBCTCG –	Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group
HF –	Falência Cardíaca
$TGF\text{-}\beta_1-$	Fator Transformador de Crescimento beta 1
RNA –	Ácido Ribonucléico
mRNA –	RNA mensageiro
ECM –	Matriz Extracelular
L TGF- β_1 -	TGF- β_1 na forma latente
RAS –	Sistema Renina-Angiotensina

INCA –	Instituto Nacional do Câncer
AngT –	Angiotensinogênio
Ang I –	Angiotensina I
ECA –	Enzima Conversora de Angiotensina
Ang II –	Angiotensina II
BK –	Bradicinina
AT 1 –	Receptor de Angiotensina tipo I
AT 2-	Receptor de Angiotensina tipo II
VEGF -	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
TC+IR –	Quimioterapia (TC) + Irradiação (20 Gy)
IR –	Irradiação (20 Gy)
mg –	Miligrama
Kg –	Quilograma
CTO –	Centro de Terapia Oncológica de Petrópolis
MV –	Megavoltagem
cm –	Centímetro
HUCFF –	Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
UFRJ –	Universidade Federal do Rio de Janeiro
ml –	Mililitro
h —	Horas
MHz –	Mega hertz
AE D –	Diâmetro do Átrio Esquerdo em Diástole
Septo D –	Espessura do Septo Interventricular em Diástole
Pp D –	Espessura da Parede Posterior em Diástole
VE –	Ventrículo Esquerdo

DC –	Débito Cardíaco
EPM –	Erro Padrão da Média
RT-qPCR –	quantitative real time Reverse transcription Polymerase Chain Reaction
Proc I –	Procolágeno tipo I
cDNA –	DNA complementar
GAPDH –	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
Vv _{[cmi]-}	Densidade de volume dos cardiomiócitos
Vv _[vaso] –	Densidade de volume dos vasos intramiocárdicos
Vv _[tc] –	Densidade de volume de tecido conjuntivo
L _{V[vaso]} –	Densidade de comprimento dos vasos intramiocárdicos
A _[cmi] –	Área seccional média dos cardiomiócitos
V _{V[vaso]} /V _{V[cmi]} -	Relação de vasos por cardiomiócitos
IMRT –	Radioterapia de Intensidade Modulada

	INTRODUÇÃO	14
1	REVISÃO DA LITERATURA	14
1.1	Câncer de Mama	14
1.1.1	Tratamento Cirúrgico para o CM	15
1.1.2	Hormonioterapia	15
1.1.3	Radioterapia	16
1.1.4	Quimioterapia	17
1.2	O Tratamento para o CM e a Cardiotoxicidade	18
1.3	A Radioterapia e a Cardiotoxicidade	21
1.4	A Quimioterapia e a Cardiotoxicidade	23
1.5	Mecanismos Envolvidos na Cardiotoxicidade	24
1.5.1	<u>A Citocina TGF-β₁ e a Fibrose</u>	25
1.5.2	A Fibrose Cardíaca	26
1.5.3	O Sistema Renina Angiotensina	28
1.5.4	O Sistema Renina Angiotensina e a Fibrose Cardíaca	30
1.5.5	Participação da Apoptose no Desenvolvimento da Cardiotoxicidade	31
1.6	Monitoramento da Cardiotoxicidade	32
2	OBJETIVOS	34
2.1	Objetivo Geral	34
2.2	Objetvos Específicos	34
3	MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1	Animais	35
3.2	Administração de Quimioterápicos	35
3.3	Simulação, Planejamento e Irradiação	36
3.4	Eutanásia dos Animais	38
3.5	Preparação das Amostras para Análises	38
3.6	Retirada das Tíbias	38
3.7	Avaliação Funcional	39
3.7.1	Exame Ecocardiográfico	39
3.7.2	Exames Físicos	39
3.8	Ensaios Moleculares	40
3.8.1	Extração de RNA Total	40

SUMÁRIO

3.8.2	Reação de Transcriptase Reversa	41
3.8.3	RT-qPCR: Elaboração dos Primers	42
3.8.4	Avaliação dos Amplicons e a RT-qPCR	43
3.9	Ensaios Histológicos	44
3.9.1	Imunohistoquímica para o anticorpo Anti-CD31	44
3.9.2	Estereologia	45
3.9.3	Coloração Azul de Toluidina	47
3.10	Análise dos Dados	47
4	RESULTADOS	48
4.1	Avaliação Funcional	48
4.2	Exames Físicos	50
4.2.1	Massa Corporal	50
4.2.2	Massa do Coração e do VE	51
4.3	Resultados dos Ensaios Moleculares	52
4.3.1	<u>Avaliação Molecular dos Níveis de Expressão de TGF- β₁ e Procolágeno</u>	
	<u>Tipo I (Proc I).</u>	52
4.3.2	Avaliação Molecular dos Níveis de Expressão de Componentes do RAS e do	
	<u>VEGF</u>	54
4.3.3	Avaliação Molecular dos Níveis de Expressão de Bax e bcl2	57
4.4	Resultados dos Ensaios Histológicos	58
4.4.1	Imunohistoquímica para o anticorpo anti-CD31	59
4.4.2	Estereologia	61
4.4.3	Avaliação Estrutural do Tecido Cardíaco	65
4.4.4	Presença de Mastócitos	68
5	DISCUSSÃO	70
6	CONCLUSÃO	77
7	REFERÊNCIAS	78

INTRODUÇÃO

O Câncer de mama é hoje um problema de saúde mundial, e sua incidência cresce a cada ano, tanto em países desenvolvidos, quanto naqueles em desenvolvimento, como o Brasil.

O presente trabalho teve como foco de estudo um efeito tardio, adverso, provocado pelo tratamento do câncer de mama, a cardiotoxicidade. Este é um assunto recente, e os mecanismos precisos envolvidos na etiologia deste efeito ainda não estão completamente esclarecidos.

Neste trabalho serão abordados os aspectos moleculares, histológicos e funcionais envolvidos na cardiotoxicidade provocada pela ação da radioterapia, associada ou não, à quimioterapia. Para este fim foi desenvolvido um modelo animal, com ratas Wistar, e o estudo foi realizado no Laboratório de Ciências Radiológicas (LCR), em colaboração com o Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doença Cardiovascular (LMMC), ambos localizados na Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Câncer de mama

O câncer é hoje considerado um problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde estimou que, no ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer (1, 2). No Brasil, as estimativas do INCA para o ano de 2012, que são válidas também para o ano de 2013, apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, sendo o câncer de mama (CM) feminina o mais incidente deles entre as mulheres, com uma estimativa de aproximadamente 53 mil novos casos. O CM é considerando um câncer de bom prognóstico, principalmente quando seu diagnóstico é precoce, e sua sobrevida média após cinco anos é de 85% em países desenvolvidos, e de 60% em países em desenvolvimento (3).

Ainda hoje a principal estratégia para a prevenção do CM é a detecção precoce. O Ministério da Saúde recomenda o rastreamento por mamografia, de todas as mulheres com idade entre 50 e 69 anos, com intervalo máximo de 2 anos entre os exames. O estadiamento do câncer de mama é baseado na classificação dos Tumores Malignos TNM, proposta pela União Internacional Contra o Câncer, conforme as características do tumor primário, dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza, e a presença ou ausência de metástases à distância. De acordo com esta classificação, o CM varia do estágio 0, onde observa-se um carcinoma *in situ*, sem comprometimento de linfonodos regionais, e sem metástases à distância; até o estágio IV, onde há a presença de uma, ou mais, metástases à distância. O estádio do tumor é considerado para que a melhor conduta de tratamento seja definida (4, 5).

O CM deve ser abordado por uma equipe médica multidisciplinar, onde devem estar presentes oncologistas, radioterapeutas e cardiologistas. As principais modalidades terapêuticas disponíveis são a cirúrgica e a radioterápica para o tratamento loco-regional e a hormonioterapia e a quimioterapia para o tratamento sistêmico, e frequentemente aplicam-se duas ou mais destas estratégias concomitantemente para obter um melhor resultado no tratamento do CM. Concentraremo-nos em explicar principalmente a radioterapia e a quimioterapia, por serem o foco deste estudo, abordando de forma resumida os demais tipos de tratamento.

1.1.1 Tratamento cirúrgico para o CM

A indicação de diferentes tipos de cirurgia depende do estadiamento clínico e do tipo histológico. Antes dos anos 80, o tratamento cirúrgico padrão envolvia a mastectomia radical, ou seja, a retirada completa da mama. No início de 1980, dois estudos randomizados da Itália e dos Estados Unidos demonstraram que a remoção apenas do câncer, e irradiação do restante da mama, chamado de cirurgia conservadora da mama, resultou em sobrevivência equivalente à mastectomia radical (6, 7). Desde então, diversos outros trabalhos foram publicados confirmando estes resultados. Estudos randomizados sugeriram também a melhoria da qualidade de vida e satisfação para mulheres tratadas desta forma. Um conceito elementar para a cirurgia conservadora é o fato da necessidade de radioterapia adjuvante no parênquima residual. Dois estudos compararam a eficácia da cirurgia conservadora com e sem a adição de radioterapia adjuvante e ambos demonstraram taxas de recorrência local inaceitáveis no grupo no qual a radioterapia foi omitida (8-10).

1.1.2 Hormonioterapia

A terapia hormonal adjuvante é frequentemente utilizada, associada à terapia local, para diminuir os riscos de recorrência e metástases a distancia. Os estrógenos são um potente estímulo para o crescimento de seus órgãos-alvo, durante o ciclo hormonal feminino: útero, vagina, e mama. A ligação entre estrógenos e o crescimento do CM serviu como incentivo para o desenvolvimento de tratamentos antiestrogênicos, levando a um importante avanço terapêutico. O tamoxifeno, um modulador seletivo do receptor de estrogênio, é administrado às pacientes que apresentam tumores com receptores hormonais positivos. Estudos mostram que este tipo de terapia aumenta significativamente a sobrevida média em 10 anos destas mulheres, além de diminuir a incidência de CM contralateral (11, 12).

1.1.3 Radioterapia

A cirurgia pode remover tumores locais detectados, ou ainda linfonodos comprometidos, porém células cancerígenas podem permanecer no local da cirurgia (no tecido mamário remanescente, na cicatriz, nos linfonodos regionais, na parede torácica), ou ainda em locais mais afastados e, se não forem eliminadas podem dar início a um novo tumor. Aproximadamente 50% das pacientes para CM recebem radioterapia (RT) para tratamento de CM, totalizando mais de 500.000 pacientes no mundo todo que recebem RT por ano. É utilizada com o objetivo de destruir as células remanescentes após a cirurgia ou para reduzir o tamanho do tumor antes da cirurgia (13).

A RT utiliza a radiação ionizante, principalmente através de feixes de fótons ou elétrons, para eliminar as células neoplásicas. A molécula de DNA é o alvo crítico para o dano induzido pela radiação ionizante, e as células neoplásicas são mais sensíveis por apresentarem alta taxa de divisão. A radiação induz, de forma direta ou indireta, o surgimento de diferentes tipos de danos genéticos, como quebras simples ou duplas na molécula de DNA, alterações de bases e ligações DNA-DNA e DNA-proteínas (14-16).

A estratégia de RT mais usada é a teleterapia, onde a fonte de radiação é externa ao paciente, a uma distância média de 80-100 cm. O tratamento é usualmente iniciado seis semanas após a cirurgia, porém no caso de tumores em estádios mais avançados, a RT pode ser usada para reduzir o tumor antes de cirurgia, ou ainda de forma paliativa para melhorar a qualidade de vida de pacientes terminais. O tratamento dura em média 5-6 semanas, totalizando 45-50 Gy em doses diárias fracionadas de 1.8-2.0 Gy. As técnicas de RT tem se tornado cada vez mais eficazes, sempre visando o aumento da dose no tumor, e diminuindo as doses nos tecidos sadios vizinhos (17-19).

A RT aplicada adjuvante à cirurgia conservadora reduz o risco de recorrência local em 50 a 70%. A RT está indicada a todas as pacientes com cirurgia conservadora, e a pacientes submetidas à mastectomia que preencham um dos seguintes critérios: a) tumor maior que 5 cm, ou que invade pele ou músculo; b) mais que três linfonodos positivos; c) linfonodos com extravasamento extracapsular (20).

1.1.4 Quimioterapia

A quimioterapia (QT), diferente da cirurgia e da radioterapia, é utilizada em tratamento sistêmico, ou seja, que atua em todo corpo, à base de fármacos que impedem a reprodução celular e, consequentemente, levam as células malignas à morte. A QT aumenta a sobrevida em pacientes com CM, e esquemas mais tóxicos produzem maior ganho relativo e absoluto. O ganho relativo é basicamente semelhante em todos os estádios. No entanto, o ganho absoluto depende diretamente do risco de recorrência.

A grande dificuldade, na escolha do melhor esquema de tratamento, reside em pesar a magnitude do ganho absoluto *vesus* a toxicidade inerente de cada tratamento (21). Existem hoje muitos esquemas de QT que podem ser aplicados para o CM, e sempre se aplicam concomitantemente dois ou mais agentes quimioterápicos, para uma maior eficácia do tratamento. Alguns dos esquemas mais conhecidos são o FAC (fluorouracil, adriamicina e ciclofosfamida) e o CMF (ciclofosfamida, metotrexato e fluorouracil), porém em quase todos a adriamicina (doxorrubicina) e a ciclofosfamida estão presentes.

Os antracíclicos, doxorrubicina e epirorrubicina, estão entre os mais efetivos tratamentos citotóxicos desenvolvidos para tratar o câncer de mama (22). Ambos melhoram a sobrevida dos pacientes de uma forma geral, aumentando o tempo livre da doença, porém as antraciclinas estão entre as drogas mais cardiotóxicas já desenvolvidas. A cardiomiopatia é dose dependente, ou seja, quanto maior a dose da droga utilizada, maior o risco do desenvolvimento da doença, o que limita seu uso no tratamento para o CM (23, 24). Alguns estudos sugerem que os esquemas contendo antracíclicos possam ser substituídos por esquemas com taxanos, sendo tão efetivos quanto os regimes tradicionais. Sugere-se utilizar quatro ciclos de docetaxel, um taxano, associado à ciclofosfamida, conhecido como esquema TC. Em um estudo feito pela US Oncology, 1016 pacientes foram selecionados randomicamente para receber doses de doxorrubicina (600mg/m²) e ciclofosfamida (600mg/m²), (AC) ou docetaxel (75mg/m²) com ciclofostafamida (600mg/m²) (TC). Sete anos após o fim do tratamento, o tempo livre da doença e a sobrevida em pacientes tratados com TC foram significativamente melhores que em pacientes tratados com AC (25-27).

Os taxanos foram introduzidos na prática clínica no início de 1990, primeiro para câncer de mama metastático, e depois no tratamento adjuvante. Ainda hoje são considerados fármacos novos, e não existem muitos estudos retrospectivos que mostrem seus efeitos colaterais em longo prazo. Os dois mais conhecidos taxanos utilizados hoje são o paclitaxel e

o docetaxel. Seus mecanismos de ação são idênticos, a principal diferença entre os dois é que o docetaxel é, em média, 1,6 vezes mais ativo que o paclitaxel (27-30).

Os taxanos são capazes de estabilizar os microtúbulos formados, impedindo sua despolimerização necessária à replicação celular, bloqueando, assim, o processo de divisão celular. Os microtúbulos são absolutamente necessários ao processo de divisão celular, sendo usados pelas células para formar uma estrutura chamada de citoesqueleto, o qual dá forma à célula e determina a posição das organelas. As propriedades dinâmicas dos microtúbulos são usadas para transmitir sinais celulares, reorganizar organelas, proporcionar mobilidade às células, intervir no processo de secreção celular e na comunicação neuronal, o que explica sua abundância nos neurônios. Devido à sua versatilidade, uso e importância no crescimento celular, os microtúbulos têm sido comumente considerados importantes alvos subcelulares para a atuação de agentes quimioterápicos. Em presença do paclitaxel ou docetaxel, ocorre uma estabilização das proteínas dos microtúbulos, pela intercalação destes fármacos resultando, assim, em distúrbio na formação do microtúbulo (31).

Outra classe de quimioterápicos utilizada, frequentemente associada aos taxanos, no tratamento do CM são os agentes alquilantes, como a ciclofosfamida. Ela foi primeiramente descrita por Arnold e Bourseaux, em 1958. Os agente alquilantes, doadores de radicais alquila, são fármacos que após sua ativação formam ligação covalente cruzada com as moléculas de DNA. O átomo de Nitrogênio 7 da guanina é particularmente susceptível à formação de ligação covalente com os agentes alquilantes, sendo portanto o principal alvo. Outros átomos nas bases purínicas e pirimidínicas, como os nitrogênios 1 e 3 da adenina, o 3 da citosina, e o oxigênio 6 da guanina, também podem ser alquilados, mas em menor grau. Esta alquilação danifica seriamente a molécula de DNA e deve ser reparada, e caso isso não seja possível, a célula entra em apoptose.

A ciclofosfamida também afeta as células sadias, mas tem menos efeito sobre estas células, uma vez que elas dividem-se mais lentamente, e são mais capazes de reparar quebras de DNA quando comparadas com as células neoplásicas. A QT adjuvante para CM incluí a ciclofosfamida em aproximadamente 90% dos casos, sendo muito eficaz no tratamento do tumor, mas não na prevenção da recorrência. Esse é o principal motivo de associá-la sempre a outros fármacos, como o docetaxel ou a doxorrubicina (32-34).

1.2 O Tratamento para o CM e a cardiotoxicidade

Um paciente com neoplasia ou pré-neoplasia, que se submete ao tratamento para câncer corre o risco substancial de deterioração da saúde cardiovascular. No passado, esse risco era menos evidente, pois sua expectativa de vida ao ter uma doença metastática era muito curta para evidenciar complicações cardiovasculares. Entretanto, com os progressos em relação ao diagnóstico, terapia, drogas e intervenções é comum que o paciente oncológico tenha considerável aumento na sua expectativa de vida, podendo até assumir que ele possui uma doença crônica. Assim, a cardiotoxicidade provocada pela terapia para o câncer é um importante assunto de estudo (35).

O *National Cancer Institute* (NCI) define cardiotoxicidade, em termos gerais, como "toxicidade que afeta o coração" (36). Apesar de saber-se que os agentes quimioterápicos e a radioterapia para tratamento de câncer afetam o coração e o sistema vascular, há carência de estudos dos efeitos colaterais em longo prazo desta terapia, assim como do entendimento claro do que é cardiotoxicidade e de como a terapia para câncer afeta o sistema cardiovascular. Uma definição padronizada de cardiotoxicidade é essencial para fins assistenciais e de pesquisa em pacientes com câncer. Nas últimas duas décadas, as definições de cardiotoxicidade dos ensaios clínicos de oncologia são baseadas nas medidas da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE). O *National Institutes of Health* (NIH) define cardiotoxicidade, segundo a FEVE em (37):

Grau I: redução assintomática da FEVE entre 10% e 20%

Grau II: redução da FEVE abaixo de 20% ou abaixo do normal

Grau III: insuficiência cardíaca sintomática

Esta definição não inclui danos cardiovasculares subclínicos que podem ocorrer em resposta a alguns agentes quimioterápicos; logo, atualmente não existe uma definição ideal de cardiotoxicidade. Em diversos casos, falta literatura em relação aos efeitos cardiotóxicos das drogas antineoplásicas, particularmente para as mais novas (38, 39).

A cardiotoxicidade pode se desenvolver de forma subaguda, aguda ou crônica. As formas agudas ou subagudas são caracterizadas pela ocorrência de anormalidade na repolarização do ventrículo esquerdo, mudanças eletrocardiográficas, arritmias ventriculares, síndromes coronarianas agudas e pericardites/miocardites observadas tanto no início da terapia quanto duas semanas após o termino do tratamento. A cardiotoxicidade crônica pode ser diferenciada em dois subtipos baseada nos sintomas clínicos: o primeiro ocorre

inicialmente, dentro de um ano após o termino da quimioterapia. E o segundo ocorre tardiamente, mais de um ano após a terapia. O sinal mais comum para a cardiotoxicidade crônica é a disfunção ventricular esquerda, diastólica e/ou sistólica, que leva à severa insuficiência cardíaca congestiva, podendo chegar ao óbito (40, 41). Porém outros sintomas que podem surgir são: hipertensão, alterações no perfil lipídico, miocardites, etc. O aparecimento destes tipos de complicação pode determinar interrupção do tratamento quimioterápico e comprometer a cura ou o adequado controle do câncer. É importante ressaltar que a insuficiência cardíaca tem pior prognóstico que muitas neoplasias e pode comprometer seriamente a evolução do paciente em tratamento (42, 43).

Existem diversos fatores que podem estar relacionados com o desenvolvimento da toxicidade cardíaca, conforme elucidado na figura 1.



Figura 1. Fatores potencialmente cardiotóxicos envolvidos no tratamento do Câncer de Mama (modificado de Chagari et al. (42).

É importante ressaltar que não existem estudos que mostrem as alterações, no coração, da associação de um ou mais destes fatores durante o tratamento para o CM. Alguns destes parâmetros são inerentes à paciente, como a idade, índice de massa corporal (IMC), estar ou não na menopausa, o histórico de doenças cardiovasculares prévias, ou ainda familiares, logo são mais difíceis de serem controlados. Outros fatores estão relacionados ao tratamento do CM, como o uso de terapias alvo, hormonioterapia, quimioterápicos e irradiação (42).

As terapias alvo são um tipo recente de tratamento contra o câncer, onde os fármacos usados identificariam e atacariam apenas as células cancerígenas, porém nem sempre isso ocorre. Um exemplo é o do Trastuzumab, um anticorpo monoclonal que se liga à proteína HER2, presente em grande escala na superfície das células neoplásicas do CM, em quase 20% das pacientes. No entanto, estudos mostraram que pacientes tratadas com este fármaco desenvolveram disfunções cardíacas tardias, e o mecanismo envolvido neste processo ainda não foi esclarecido (44, 45).

A hormonioteria, como já citado anteriormente, é realizada através do uso de tamoxifeno ou de inibidores de aromatase, com o objetivo de reduzir os níveis de estrogênio das pacientes. Porém o uso desta terapia está associado ao aumento do risco de tromboembolismo venoso. Sua associação com a cardiotoxicidade ainda está em estudo, e os resultados são controversos (11, 46). Por ser o principal foco deste estudo, a associação entre quimioterapia e/ou radioterapia e cardiotoxicidade será abordada em detalhe nas próximas secções.

Desta forma, pode-se afirmar que a toxicidade cardíaca é considerada hoje uma das mais importantes complicações no tratamento para o câncer. Em cânceres com alta taxa de sobrevida, como mama e próstata, é de suma importância considerar os riscos cardiovasculares do tratamento.

1.3 A radioterapia e a cardiotoxicidade

Embora muitos estudos mostrem claramente o benefício da radiação, outros confirmam que a terapia também causa algumas toxicidades. Pacientes tratados para CM com a radiação têm maior risco de desenvolverem CM contralateral, câncer de pulmão e mortalidade por doença cardíaca. O aumento na mortalidade por doenças cardíacas nos pacientes irradiados diminui o benefício da radiação quando consideramos a sobrevida do paciente (47).

A irradiação do tórax pode causar danos ao pericárdio, miocárdio, valvas e artérias coronárias, sendo o pericárdio a estrutura mais frequentemente acometida. A incidência de

complicações cardiovasculares induzidas por radioterapia é maior com altas doses de irradiação e com a associação de quimioterapia com antracíclicos (48).

A doença cardíaca radioinduzida (RIHD) é definida como as alterações clínicas e patológicas decorrentes da injúria cardíaca causada pela irradiação do tecido neoplásico adjacente. As manifestações clínicas da RIHD incluem: pericardite, miocardite, doenças coronarianas e valvulopatias, entre outras. A RIHD é uma doença progressiva e tanto sua incidência quanto severidade aumentam quanto maior a dose absorvida pelo coração, menor a idade do paciente no momento da radioterapia, maior tempo decorrido desde o tratamento, e com o uso concomitante de agentes quimioterápicos (49, 50).

O dano vascular causado pela radioterapia pode ser silencioso; aproximadamente 50% dos pacientes assintomáticos desenvolvem alterações de perfusão no miocárdio. Do ponto de vista clínico, a consequência mais importante da RIHD é o dano ao miocárdio, que parece ser resultante da diminuição do fluxo sanguíneo decorrente do dano causado na microcirculação cardíaca, podendo levar à fibrose do tecido (51). Dados da necropsia de pacientes jovens tratados com irradiação torácica para linfoma de Hodgkin's, com doses superiores a 36 Gy, mostraram um aumento de fibrose no pericárdio, miocárdio e endocárdio, além de severa aterosclerose nas artérias coronarianas, no volume cardíaco irradiado (49).

Sabe-se que os cardiomiócitos são pouco afetados pela irradiação, o principal dano cardíaco ocorre nas células endoteliais, devido principalmente à sua maior taxa de divisão celular, e maior tempo de recuperação dos danos radioinduzidos. A hipótese mais aceita sobre a causa da RIHD é que a radiação ionizante cause apoptose dos microvasos sanguíneos cardíacos, diminuindo o fluxo sanguíneo do tecido, levando a um quadro de isquemia miocárdica. Os grandes vasos coronarianos também podem ser afetados pela irradiação, porém este será um efeito tardio, e sua consequência é a aterosclerose, um espessamento da parede das artérias. O intervalo médio para o surgimento de doenças coronarianas após radioterapia é de 82 meses. É importante ressaltar que os efeitos colaterais cardíacos devido à radiação ionizante não são completamente explicados em termos radiobiológicos, principalmente devido ao coração apresentar estruturas com sensibilidades muito distintas à radiação (52-54).

Um estudo realizado pelo grupo EBCTCG, com aproximadamente 20.000 mulheres que receberam RT para CM, mostrou um aumento de 30% na incidência de mortalidade decorrente de doenças cardiovasculares, além de mostrar também uma redução da mortalidade nestas pacientes decorrente do CM (55). Embora outros estudos confirmem estes resultados, todos foram realizados com pacientes tratados entre 1970 e 1980, e as técnicas

hoje de RT evoluíram muito. E como RIHD é um efeito tardio da terapia, ou seja, demora ao menos uma década para que os sintomas possam aparecer, ainda não existem estudos conclusivos considerando as técnicas mais modernas de RT usadas a partir do ano 2000 (56).

1.4 A quimioterapia e a cardiotoxicidade

O sistema cardiovascular tem numerosos e diferentes alvos que podem sofrer danos após a QT para o tratamento do CM. Alguns fármacos diretamente lesionam os cardiomiócitos e causam inflamação no pericárdio. Outros afetam o sistema de coagulação e podem ocasionar diminuição do calibre dos vasos, predispondo o paciente a tromboses e isquemia cardiovascular. E ainda, alguns agentes quimioterápicos antiangiogênicos causam hipertensão arterial, provocando hipertrofia e insuficiência cardíaca (35, 57).

A cardiotoxicidade causada por uma droga depende de fatores intrínsecos a ela, e também do paciente. Entender melhor estes fatores pode ajudar a reduzir o aparecimento das doenças cardíacas. A dose da droga aplicada em cada sessão de quimioterapia, dose acumulada, intervalo entre sessões, combinação das drogas aplicadas, e a sequencia de administração dessas drogas são fatores que podem influenciar na cardiotoxicidade. (58).

Alguns quimioterápicos estão associados com o desenvolvimento de disfunção ventricular esquerda e/ou falência cardíaca (HF), entre eles a doxorrubicina, ciclofosfamida e docetaxel. A HF foi associada à ciclofosfamida em 7 a 28% dos pacientes em um estudo de coorte. O risco de cardiotoxicidade parece estar relacionado com a dose, e ocorre entre 1 e 10 dias após a administração da primeira dose de ciclofosfamida. A incidência de HF associada ao docetaxel varia de 2.8 a 8% (53, 59).

Um possível mecanismo pelo qual os taxanos podem causar cardiotoxicidade é devido à massiva liberação de histamina. Em estudos com animais, a estimulação dos receptores de histamina no tecido cardíaco resulta em arritmias. Recentemente, o estudo experimental de Casini S. et al. sugere que os taxanos reduzem a função dos canais de sódio do miócito, sendo esta a provável causa do aparecimento das arritmias (60).

Alternativamente, a indução da cardiotoxicidade por taxanos pode ser atribuída aos danos causados ao músculo cardíaco via efeitos nas organelas subcelulares. As moléculas anti-microtúbulos, como o docetaxel, podem causar bradicardia sinoatrial, bloqueio atrioventricular, taquicardia ventricular, hipotensão, HF e isquemia. Ainda há carência de

estudos que relacionem o docetaxel com a cardiotoxicidade, e que expliquem o mecanismo com o qual isto ocorre (61).

Os efeitos de alguns agentes quimioterápicos no sistema de coagulação podem promover estreitamento dos vasos, que é um precursor para trombose e tromboembolia, consequentemente para isquemia cardiovascular. Ainda não se sabe como os inibidores antiangiogênicos alteram a hemostase normal, eles provavelmente alteram a função ou a integridade do endotélio vascular. Danos aos vasos podem envolver lesões à camada íntima ou ruptura da comunicação endotelial célula-célula. Em ambos os casos, a perda da integridade dos vasos ativa a cascata de coagulação. O tromboembolismo venoso foi associado a diversas categorias de agentes quimioterápicos, entre elas os agentes alquilantes, como a ciclofosfamida (35). Os principais efeitos cardíacos causados por esses agentes incluem falência cardíaca, miocardite ou pericardite. Os mecanismos precisos da cardiotoxicidade induzida por ciclofosfamida são desconhecidos. Uma das hipóteses é que a ciclofosfamida provoque danos diretos ao endotélio, seguido de extravasamento de metabólitos tóxicos, resultando em dano aos cardiomiócitos, hemorragia e edema. Necrose hemorrágica, edema intersticial, depósito de fibrina, lesões endoteliais, trombos microvasculares, áreas isquêmicas e bandas de contração são as principais consequências da insuficiência cardíaca aguda relacionada à ciclofosfamida (53, 62, 63).

Desta forma, percebemos que os efeitos dos danos cardíacos induzidos pelo docetaxel e pela ciclofosfamida são ainda pouco conhecidos. Não se sabe se eles afetam a liberação de proteínas pró-apoptóticas ou a geração de radiacais livres, como acontece no tratamento com a doxorrubicina. E particularmente sobre o docetaxel, sua ação nas células endoteliais ainda não é esclarecida.

1.5 Mecanismos envolvidos na cardiotoxicidade

Dentre os efeitos adversos da quimioterapia e da radioterapia no sistema cardiovascular destaca-se, pela sua maior frequência e gravidade, a agressão miocárdica com disfunção ventricular sistólica e insuficiência cardíaca. São muitos os mecanismos envolvidos na cardiotoxicidade causada pelo tratamento do CM, e nem todos são completamente esclarecidos, porém o endpoint observado é o mesmo, a fibrose cardíaca (64).

1.5.1 <u>A citocina TGF- β_1 e a fibrose</u>

O Fator Transformador de Crescimento beta 1 (TGF- β_1) controla diversos fatores como desenvolvimento, diferenciação, reparo tecidual, tumorigênese e funções imunoendócrinas. As proteínas TGF- β_1 são secretadas pela maioria das células dos mamíferos, e sua ação é mediada localmente de forma autócrina/parácrina (65).

O TGF- β_1 também desempenha importante papel no desenvolvimento e hipertrofia cardíacos, remodelamento ventricular, e resposta inicial ao infarto de miocárdio. Embora o mecanismo preciso envolvido na transição de colágeno e subsequente fibrose durante o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca não seja totalmente esclarecido, existem evidências que sugerem a produção local de TGF- β_1 . O TGF- β_1 é uma citocina regulatória importante no reparo tecidual, e sua contínua produção está relacionada à fibrose (65, 66).

Próximo à lesão tecidual no miocárdio o TGF- β_1 (liberado por linfócitos, plaquetas, macrófagos ativados, e fibroblastos) aumenta a deposição de matriz extracelular para reparar os danos. Isto ocorre devido ao estímulo na produção de colágeno, fibronectina e proteoglicanos, inibição da síntese de proteases e estímulo da síntese de inibidores de proteases. Os efeitos biológicos do TGF- β_1 são aumentados pela auntoindução de sua produção nas células da matriz. Durante repetidos danos, há uma contínua autoindução na produção de TGF- β_1 , levando à contínua produção de matriz extracelular e à fibrose do tecido. Existem três isoformas do fator de crescimento Beta: TGF- β_1 , TGF- β_2 e TGF- β_3 . Todos desempenham importante papel na regulação do crescimento celular, diferenciação, produção de matriz e apoptose (65, 67).

Os receptores de TGF- β_1 estão presentes nos ventrículos esquerdo e direito do coração de ratos sadios. O modelo de rato com hipertrofia cardíaca, desenvolvido por Villareal e Dillmann, demonstrou que aumento de mRNA TGF- β_1 precedem aumento dos níveis de mRNA de proteínas da matriz extracelular, sugerindo um possível papel regulatório do TGF- β_1 em processos de remodelamento do miocárdio. Um aumento na expressão de mRNA TGF- β_1 e proteínas também foi encontrado na região infartada do miocárdio, dois dias após o infarto, sugerindo que o TGF- β_1 desempenha papel na cicatrização do tecido (68, 69).

Duas características importantes na resposta do TGF- β_1 a injúrias são: autoindução de sua produção, e aumento da deposição de matriz extracelular induzida pelo próprio TGF- β_1 . Esta citocina estimula a síntese dos componentes da matriz extracelular, como fibronectina, colágeno e proteoglicanos; e simultaneamente inibe a degradação da matriz extracelular, diminuindo a síntese de protease e aumentando os níveis de inibidores de protease. Uma conseqüência indesejável dos efeitos do TGF- β_1 é que a excessiva deposição de matriz extracelular no local da injúria, associada a sua habilidade de auto-indução, pode levar à fibrose de uma forma crônica e progressiva, acarretando a perda de estrutura do tecido. Várias evidências salientam o envolvimento de TGF- β_1 no processo de fibrose do tecido cardíaco e em outros órgãos irradiados. Sua expressão aumentada está associada diretamente com o aumento do tecido fibrótico e com a progressão do remodelamento do tecido exposto à radiação ionizante (65, 70).

1.5.2 <u>A Fibrose cardíaca</u>

O coração é formado por, cardiomiócitos e outros tipos celulares como: fibroblastos, células endoteliais, e ainda por matriz extracelular. Os cardiomiócitos compõe 1/3 do total das células cardíacas, formando 70 a 80% da sua massa. Os fibroblastos cardíacos são as células mais predominantes no coração, depois dos cardiomiócitos, seguidos das células endoteliais e das células musculares lisas dos vasos ali presentes. Assim, fatores que afetem a quantidade e funcionamento dessas células podem ter efeitos importantes na estrutura, fisiologia e desempenho normal do tecido cardíaco (71). Até o final de 1970, a pesquisa cardiovascular foi focada apenas nos cardiomiócitos, e a importância das células não-miócitos na fisiologia normal e patológica do coração foi ignorada. A partir de então, vários grupos de pesquisa elucidaram o papel dos fibroblastos e miofibroblastos, e os definiram como reguladores críticos da função cardíaca. Os miofibroblastos têm um extenso retículo endoplasmático rugoso e complexo de golgi, característico de fibroblastos. Em contraste com fibroblastos, eles apresentam extensos feixes de microfilamentos de actina, lembrando as miofibrilas do múculo liso. Os miofibroblastos produzem proteínas da matriz extracelular via secreção autócrina/parácrina de TGF- β_1 e, são responsáveis pelo remodelamento/fibrose do tecido. Os miofibroblastos são eliminados por apoptose após o término do processo de fibrose (65, 72).

A fibrose tecidual é caracterizada por acúmulo de colágeno e outros componentes da matriz extracelular (ECM), seguida do desequilíbrio entre a síntese e degradação da ECM. A ECM intersticial é composta por uma mistura de proteínas (colágeno e elastinas), glicoproteínas (fibronectina, laminina e tenascina), proteoglicanos, e glicosaminoglicanos

(heparina e sulfato de condroitina) sobre um gel hialurônico composto por longas cadeias de polissacarídeos. Existem 42 genes de colágeno humanos, cada um codifica uma molécula de pró-colágeno, que se juntam para formar uma longa tripla hélice (73).

Cinco isoformas de colágeno estão presentes no miocárdio: tipo I, III, IV, V e VI. O colágeno tipo I, um heterodímero de subunidades α, é o maior subtipo de colágeno produzido por fibroblastos cardíacos, representando aproximadamente 80% do total. O colágeno tipo III é relativamente abundante no miocárdio, representando aproximadamente 10% do total; e os subtipos IV, V e VI representam juntos 10% do colágeno total. O colágeno tipo I está presente sob a forma de fibras espessas, com grande força de resistência à tensão, sendo responsáveis pela rigidez na diástole do miocárdio. O colágeno tipo III está presente na forma de finas redes, e é mais elástico que o tipo I. O remodelamento da ECM durante a cicatrização normal e reparo requer uma delicada regulação de diversas proteínas envolvidas na síntese e degradação da ECM, incluindo proteínas estruturais, proteases e inibidores de protease (65, 73).

Uma das mais conceituadas hipóteses da radiobiologia afirma que os danos vasculares são os primeiros sinais patogênicos que antecedem a fibrose. Estudos mostram que alterações na permeabilidade vascular estão associadas com o acúmulo de fibrina no espaço extravascular após doses únicas de radiação em ratos. A depleção microvascular também pode causar isquemia, e hipóxia tecidual, que são importantes fatores para o desenvolvimento da fibrose. As respostas imunes a injúrias, como radiação ou alguns agentes quimioterápicos, podem ser inatas (agudas) ou adaptativas (crônicas). Nesta reação, as células inflamatórias, neutrófilos, linfócitos, monócitos e macrófagos, liberam citocinas que estimulam fibroblastos e outras células progenitoras a se diferenciarem em miofibroblastos. Os miofibroblastos são produtores de colágeno (principalmente tipos I e III), fibronectina e outros componentes da ECM; eles têm atividades contráteis e metabólicas e podem ser fenotipicamente transformados em fibroblastos expressando actina, sendo responsáveis pela reposição de colágeno no reparo do miocárdio. Em casos normais, os miofibroblastos e as células inflamatórias entram em apoptose. Porém em casos de inflamação crônica, estas células persistem no meio, assim como suas citocinas liberadas (73, 74).

Os fibroblastos locais não são a única fonte de miofibroblastos. Células epiteliais, endoteliais e musculares lisas também podem ser progenitoras. Monócitos são também precursores de fibroblastos. A ativação dos progenitores de miofibroblastos acontece em resposta a sinalizações parácrinas, e a mais conhecida é o TGF- β_1 , produzido por diversas

células inflamatórias, epiteliais e endoteliais. A fonte imediata de TGF- β_1 ativado é de uma reserva extracelular, onde esta citocina está estocada na sua forma latente (L TGF- β_1), ligada à ECM. Uma vez ativado, TGF- β_1 é então liberado por ação de proteases (plasmina e trombina) e por espécies reativas de oxigênio, provenientes da radiação ionizante, ou ainda de alguns quimioterápicos (73, 75).

1.5.3 O sistema renina-angiotensina

O conhecimento do sistema renina-angiotensina (RAS) avançou muito nos últimos anos desde o clássico sistema endócrino que explica a manutenção da homeostase corporal e da pressão arterial a um novo conceito que inclui uma serie de RAS locais que operam independentemente em diversos órgãos.

A ativação do RAS clássico inicia-se pela síntese de reninas pelas células justaglomerulares da arteríola eferente renal. Nessas células, a preprorenina é transformada em prorenina e posteriormente em renina ativa, que é então liberada na circulação. A secreção da renina pelos rins é estimulada pela diminuição do volume sanguíneo, aumento da concentração de sal nos túbulos distais, atividade do nervo simpático renal e diminuição da perfusão renal. No sangue, a renina cliva o angiotensinogênio (AngT), originado no fígado, formando o decapeptídeo inativo, angiotensina I (Ang I). A enzima conversora de angiotensina (ECA) hidrolisa a Ang I em Ang II, octapeptídeo biologicamente ativo. A ECA é encontrada principalmente nas células endoteliais, especialmente no endotélio pulmonar. Além de clivar a Ang I, a ECA metaboliza a bradicinina (BK), um vasodilatador, para BK-(1-7) inativa. Ou seja, a ECA tem dupla função na vasculatura, aumenta a produção de Ang II, um potente vasoconstritor, e degrada BK, um vasodilatador (76).

Os efeitos adrenais, renais, cardíacos e vasculares da Ang II são mediados através de dois receptores, tipo 1 (AT₁) e tipo 2 (AT₂), que agem em direções opostas. A maior parte dos efeitos patofisiológicos da Ang II é mediada pelo receptor AT₁, que incluem vasoconstrição, secreção de aldosterona, reabsorção renal de sódio, inflamação cardiovascular, hipertrofia e fibrose (77).

Os receptores AT_2 são pouco expressos nos tecidos adultos, e suas ações são antagônicas às dos receptores AT_1 . O AT_2 estimula vasodilatação, natriurese, ação antiinflamatória e anti-fibrótica, e inibição do crescimento celular (77).

A renina sempre foi considerada uma enzima responsável pela produção de Ang I, sem ter nenhuma outra ação biológica. Porém, hoje se sabe que a prorenina e a renina se ligam a receptores específicos, que ativam moléculas sinalizadoras, que por sua vez promovem crescimento celular e fibrose, independente de Ang II, nos cardiomiócitos, células mesangiais, células endoteliais, células musculares lisas vasculares, podócitos e células do túbulo distal (76, 78)

O RAS circulante é um dos muitos RAS existentes, e o RAS dos tecidos pode funcionar de forma independente do sistema circulatório. Os sistemas dos tecidos caracterizam-se pela presença de alguns, ou até de todos os componentes do RAS, incluindo renina, AngT, ECA, Ang I, Ang II e receptores AT, e são encontrados no coração, vasos, rins, glândula adrenal, pâncreas, sistema nervoso central e nos tecidos linfático e adiposo. Embora seja bem estabelecido que a Ang II dos tecidos seja produzida pela Ang I local, não se sabe ao certo se a renina é sintetizada localmente, ou se os tecidos usam a renina liberada pelos rins na circulação (76, 79).

Um RAS local cardíaco foi postulado através de diversos estudos, porém, ainda faltam evidências sobre a produção de Ang I e II no coração pela ação da renina sintetizada *in situ*. Os níveis de renina no coração são normalmente muito baixos, e raramente detectados, e provavelmente a renina encontrada é a produzida nos rins. Um estudo realizado por De Mello et al. sugere uma sequência de eventos no RAS cardíaco: a renina, captada da circulação pelo coração, atua no tecido, no AngT para formar a Ang I. A Ang I é então convertida localmente em Ang II principalmente pela ECA. A Ang II regula, através da ativação de receptores específicos (AT₁ ou AT₂), contratilidade cardíaca, comunicação celular, e propagação de impulsos. Além disso, a Ang II está envolvida no remodelamento cardíaco, crescimento e apoptose. O receptor AT₁ tem 2 subtipos: AT_{1A} e AT_{1B}. O receptor AT_{1A} é o principal regulador da pressão sanguínea e da estimulação do crescimento de cardiomiócitos, enquanto receptor AT_{1B} está envolvido no controle do tônus vascular. Os receptores AT₁, em miócitos de ratos, estão localizados no sarcolema, túbulos T e núcleo (80).

1.5.4 O sistema renina-angiotensina e a fibrose cardíaca

Como foi mostrado anteriormente, a irradiação na região torácica e alguns agentes quimioterápicos podem induzir o remodelamento cardíaco, caracterizado pela fibrose, elevando o risco para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca. Hoje, sabe-se que a Ang II, um dos principais componentes do RAS, não está apenas envolvida na regulação da pressão arterial, mas também na gênese e progressão da fibrose em vários tecidos. Assim, um aumento nos níveis de Ang II tem sido relacionado com a patogênese de doenças fibróticas em órgãos como o fígado, rins e coração (81).

A Ang-II é uma potente indutora de proteínas da ECM, tais como o colágeno tipo I e de fibronectina, através do receptor AT₁ em diversos tecidos e tipos de células, entre as quais as células do músculo cardíaco. Um dos mecanismos pelos quais a Ang-II induz a fibrose é através do aumento da expressão da citocina pró-fibrótica TGF- β_1 . Estudos mostram que infusão crônica de Ang II em ratos induz a proliferação de fibroblastos cardíacos e a síntese de proteínas da ECM nas zonas intersticiais e perivascular do coração. Outros trabalhos comparam culturas de cardiomiócitos de ratos e fibroblastos em relação à expressão de receptores AT₁, e mostram que os fibroblastos expressam 10 vezes mais este tipo de receptores que os cardiomiócitos (82). Estes resultados sugerem que os fibroblastos são o principal alvo da Ang II. Logo, a hipótese aceita para o mecanismo de fibrose induzida por Ang II postula que a Ang II ativa diretamente fibroblastos cardíacos, a Ang II aumenta a síntese de proteínas, a produção de colágeno, e a expressão de TGF- β_1 (83).

Em situações patológicas, os níveis cardíacos de Ang II elevam-se devido ao aumento dos níveis de renina no plasma, que permitem que o coração sequestre mais renina da circulação, e, além disso, nessas condições os níveis cardíacos de ECA também se elevam (80). Estudo desenvolvido com ratos irradiados, simulando um tratamento para câncer de mama, com dose de 20 Gy demonstra que o aumento de TGF- β_1 e de componentes RAS (da ECA e do receptor AT₁) ocorre de forma simultânea, sugerindo uma possível interação dos mesmos em uma comum rota de sinalização (64). Porém não foram encontrados pelo nosso grupo, na literatura, estudos que apresentem dados referentes à expressão do RAS após o tratamento concomitante com QT e RT.

Numerosos ensaios randomizados, placebo-controlados, demonstram que o uso de inibidores da ECA ou de bloqueadores do receptor AT_1 tem prevenido o surgimento de

complicações cardíacas em pacientes assintomáticos ou impedindo a progressão em pacientes sintomáticos. O tratamento com inibidores de ECA, ou com antagonistas de AT₁, atenuam a fibrose cardíaca, apresentando efeitos mais benéficos sobre o coração do que o esperado unicamente em função da redução da pressão arterial. (84). A administração de fármacos moduladores do RAS já é utilizada e tem mostrado ser efetiva na prevenção do desenvolvimento de lesões tardias, decorrentes da irradiação e quimioterapia (85).

1.5.5 Participação da apoptose no desenvolvimento da cardiotoxicidade

Durante a última década, várias evidências sugerem que a apoptose seja um importante mecanismo envolvido no desenvolvimento e progressão de doenças cardiovasculares. Processos apoptóticos são regulados por várias proteínas incluindo, Bax e Bcl2 que desempenham papéis importantes neste contexto. Na verdade, a expressão de Bcl2 e Bax é um checkpoint intracelular essencial para a regulação do processo de apoptose, ou seja, da morte celular programada. A superexpressão de Bcl2 promove a sobrevivência de células in vitro e in vivo, ou seja, é uma proteína com função anti-apoptótica (86). Enquanto que, quando o Bax é superexpresso, o processo de morte por apoptose é acelerado. Assim, a proporção Bax/Bcl2 é importante para determinar a susceptibilidade celular à apoptose (87). No miocárdio, a apoptose já foi relacionada com inúmeras patologias cardíacas, incluindo hipóxia, isquemia, infarte do miocárdio, hipertrofia do miocárdio, e, mais recentemente, em pacientes com fase final da insuficiência cardíaca (88). Um estudo desenvolvido por Hochhauser et al. mostrou que camundongos knockout para Bax mostraram melhor função contrátil cardíaca, menos lesão mitocondrial e menor área de infarto após lesão isquêmica induzida, quando comparados com comparação com os seus homólogos, com expressão normal de Bax. Este resultado, junto a outros similares, mostrou que o Bax desempenha um papel pró-apoptótico em cardiomiócitos (89, 90). Além disso, outras publicações relatam a importância da função anti-apoptótica da proteína bcl-2 na recuperação de lesões no miocárdio (91, 92).

O estímulo para a apoptose pode ser mediado por fatores sistêmicos ou locais. A expressão acentuada do RAS, mediadores adrenérgicos e outras citocinas (TGF- β_1) podem estar envolvidos nesse processo. O aumento local de ang II, atuando via AT₁ foi relacionado

ao aumento da expressão de proteínas relacionadas à apoptose de cardiomióciotos, em modelos que estudavam a irradiação cardíaca em ratos (64, 93).

1.6 Monitoramento da cardiotoxicidade

Cardiologistas e oncologistas enfrentam hoje o desafio de avaliar a função cardíaca de pacientes que estão se submetendo, ou ainda irão se submeter, a terapias potencialmente cardiotóxicas, e identificar os pacientes que estão em risco. A avaliação deve inicialmente incorporar a realização de anamnese e exame físico, focados para a área cardiovascular, um eletrocardiograma em repouso e avaliação basal da função ventricular esquerda pela ecocardiografia (61). A ecocardiografia, uma técnica não invasiva, é um dos métodos mais comuns usados para monitorar a cardiomiopatia induzida por quimioterapia. Trata-se de um método que permite verificar as funções de sístole e diástole, sendo esta última mais sensível a alterações iniciais na função cardíaca. A fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) é um dos mais importantes sinais de doença cardíaca. Pacientes com fração de ejeção substancialmente reduzida têm pior prognóstico (94).

O monitoramento de sinais e sintomas de insuficiência cardíaca é aspecto fundamental do manejo de pacientes que se submetem a terapia oncológica cardiotóxica. Atenção especial deve ser dada às manifestações clínicas precoces de toxicidade, que embora ocorram raramente, podem se apresentar como quadro clínico de miocardite aguda fulminante e/ou arritmias ventriculares graves. Como a toxicidade pode se manifestar em qualquer momento após o uso de quimioterápicos, até mesmo vários anos após a finalização do tratamento, faz-se necessária vigilância contínua das manifestações clínicas da síndrome, com avaliação de sintomas pouco específicos como cansaço, fadiga e limitação funcional para as atividades do dia a dia (41). O monitoramento periódico da cardiotoxicidade durante os ciclos de quimioterapia é uma estratégia essencial para prevenir lesões miocárdicas graves e irreversíveis, embora não existam estudos prospectivos randomizados que tenham testado tal conduta.

Diversas diretrizes internacionais recomendam a avaliação da FEVE em diferentes momentos do tratamento: (I) antes do início de terapia antineoplásica potencialmente cardiotóxica, (II) depois da administração de metade da dose total cumulativa ou após doses específicas de antraciclinas ou equivalentes, e (III) após cada ciclo subsequente de quimioterapia. No seguimento, após a finalização do tratamento oncológico, recomenda-se avaliação da FEVE em intervalos variáveis, de acordo com o risco basal de cardiotoxicidade1. O comportamento da FEVE no acompanhamento tem importantes implicações terapêuticas. São critérios aceitos e validados para suspensão do tratamento a redução da FEVE maior que 10% e/ou redução para valores absolutos menores que 50%. A principal desvantagem da ecocardiografia é ser ineficaz na detecção precoce, o diagnóstico da cardiotoxicidade só é feito quando a lesão já está bem estabelecida, e é irreversível na maior parte das vezes (40, 61, 95).

Como vimos, cardioncologia é uma especialidade médica que vem ganhando importante papel no controle da cardiotoxicidade causada pelo tratamento do câncer. Porém os mecanismos envolvidos no desenvolvimento deste efeito tardio ainda não são completamente elucidados. Muitos estudos relacionados à cardiotoxicidade tendem a relatar os efeitos isolados da RT ou da QT; e, no entanto, existe um déficit de informações, incluindo ambas as modalidades de tratamento. Dessa forma, torna-se importante estudar os fenômenos envolvidos nas complicações cardíacas, possibilitando o surgimento de novas estratégias que melhorem a qualidade de vida dos pacientes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este projeto teve o objetivo de avaliar e comparar os efeitos induzidos pela radiação, pela administração de quimioterapia e por suas aplicações associadas no coração de ratas Wistar (*Rattus novergicus*).

2.2 Objetivos específicos

- Observar as possíveis alterações funcionais e morfológicas do coração, quando exposto à irradiação e/ou quimioterapia;

- Avaliar quantitativamente os componentes do tecido cardíaco, através da estereologia;

- Avaliar as alterações na expressão de componentes moleculares envolvidos no processo de fibrose (TGF- β_1 e procolágeno tipo I);

- Analisar o nível de AT₁, ECA, Renina, angiotensinogênio (AngT) e do fator de crescimento endotelial vascular VEGF na participação do remodelamento cardíaco.

- Observar alterações no nível de mRNA de Bax e Bcl2, envolvidos no processo de apoptose e associá-los à disfunção cardíaca;
3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Ratas Wistar (*Rattus norvegicus*), com idade aproximada de três meses (jovens adultas), pesando entre 190 e 210 gramas foram mantidas em biotério, com ciclo de luminosidade e temperatura controladas. Os animais permaneceram em gaiolas de plástico apropriadas, contendo serragem, e receberam água potável e ração *ad libitum*. Os animais tiveram massa corporal aferida semanalmente durante todo o experimento. Conforme pode ser observado no quadro 1, as ratas foram divididas em diferentes grupos, cada um contendo 7 ratas. Esse número foi adotado em virtude do tamanho de amostra ser suficiente para se testar a normalidade dos dados, dentro de cada amostra e, dessa forma, se escolher o teste estatístico apropriado para análise dos resultados. A distribuição dos animais, nos diferentes grupos experimentais, foi realizada de forma randômica.

Quadro 1- Distribuição dos animais, de acordo com o tratamento realizado.

Grupos	# Animais	Tratamento
Controle	7	Controle
TC+IR	7	Quimioterapia (TC) + Irradiação (20Gy)
IR	7	Irradiação (20Gy)

3.2 Administração de quimioterápicos

Nos grupos específicos, o poliquimioterápico TC foi administrado pela via intraperitoneal (ip), com os animais previamente anestesiados com ketamina/xilazina (1ml/g). Foram realizados 4 ciclos TC, com intervalo de 7 dias entre eles. Cada animal recebeu 50mg/Kg de ciclofosfamida e 12,5 mg/Kg de docetaxel. A figura 2 mostra um animal recebendo o quimioterápico docetaxel. A dose administrada para cada uma das drogas, em cada ciclo, foi calculada adequadamente para ser equivalente à dose por ciclo de quimioterapia em humanos (96). Após 7 dias do último ciclo de quimioterapia, os animais

dos grupos TC+IR foram irradiados. Os animais do grupo IR não receberam quimioterapia, sendo apenas irradiados. O Grupo controle recebeu volume de solução NaCl 0,9% equivalente ao volume de quimioterápico, também em 4 ciclos espaçados por 7 dias.

A quimioterapia nos animais foi realizada no Centro de Terapia Oncológica (CTO), em Petrópolis, RJ.



Figura 2. Animal do grupo TC+IR recebendo quimioterapia.

3.3 Simulação, planejamento e irradiação

Antes da irradiação dos ratos, foi realizada uma simulação prévia do procedimento. Esse procedimento tem o propósito de determinar a geometria espacial para o posicionamento do rato durante a irradiação. Para isso, os animais foram anestesiados com ketamina/xilazina (1ml/g) e imobilizados em suportes de isopor. Em seguida, o animal foi submetido a uma tomografia com o objetivo de se obterem as imagens requeridas para o planejamento da irradiação. Foi utilizado o tomógrafo Helicoidal Computadorizado; Fabricante: General Electric; Modelo: HiSpeed 2246999-3; Série: 8219794M2.

Com as imagens obtidas, durante a simulação, foi possível realizar o planejamento da irradiação no volume cardíaco do rato (no sistema CadPlan da Varian), determinando-se com

isso a geometria espacial e tamanho do campo de irradiação (campo antero-posterior, $2x2cm^2$).

Um aspecto importante a ser ressaltado são as dimensões anatômicas do tórax do rato, onde o coração se encontra muito próximo da parede anterior do tórax (aproximadamente 1cm abaixo). Dada a energia nominal do feixe de raios-X, utilizado (6 MV), o máximo de dose é alcançado a 1,5 cm de profundidade. Por esse motivo foi imprescindível a utilização de um bólus (material com densidade equivalente ao tecido, utilizado para o deslocamento da curva do máximo de dose em direção à superfície) de 0,5 cm, para que a dose máxima atingisse o centro do coração.

Durante o procedimento de irradiação, as ratas do grupos TC+IR e IR foram anestesiadas com ketamina/xilazina (1 mg/Kg) e imobilizadas com o suporte de isopor. Isso garante a permanência do rato na mesma posição, no decorrer do procedimento. Os ratos foram irradiados com dose única (20 Gy), através do acelerador linear Varian® (Clinac 2100), em posição supina, com feixe raios-X de energia nominal de 6 MV e taxa de dose de 240 cGy/min, conforme mostra a figura 3. Os animais do grupo controle foram anestesiados e posicionados da mesma forme que aqueles dos grupos TC+IR e IR, porém não foram irradiados. A dose de 20 Gy foi utilizada por apresentar bioequivalência com a dose de 45 a 60 Gy em pacientes expostos à radioterapia para câncer de mama (97).



Figura 3. Irradiação dos animais dos grupos TC+IR e IR. A) Animal no suporte de isopor; B) animal posicionado para a irradiação.

A tomografia e a irradiação foram realizadas no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF / UFRJ).

3.4 Eutanásia dos animais

Após a irradiação, os animais retornaram às caixas de origem e permaneceram sob observação constante até a data da eutanásia (5 meses após o tratamento), com 9 meses de idade. A data foi escolhida, pois estudos anteriores mostraram que, a partir de 4 meses, podese observar lesões cardíacas em ratos expostos à radiação ionizante, com dose única de 15Gy (64). No dia da eutanásia os animais foram anestesiados Ketamina/Xilazina (1ml/g) e pesados. Em seguida, foi injetado cloreto de potássio no ventrículo esquerdo, de forma a garantir que todos os animais teriam parada cardíaca em diástole, como forma de padronização. Posteriormente o coração foi então pesado, e seccionado para a preparação das amostras, de acordo com a técnica a ser empregada.

3.5 Preparação das amostras para análises

Foram coletadas amostras para as técnicas de RT-qPCR e microscopia óptica. Para cada uma das técnicas mencionadas o material selecionado foi preparado de forma adequada. Para a RT-qPCR o ápice do VE de cada animal foi cortado em partes muito pequenas, colocado em criotubo, e armazenado imediatamente a -80°C. No caso das amostras para microscopia óptica, a parte medial do VE colocado em formalina 10% tamponada de Millong, para o posterior processamento, 48h depois.

3.6 Retirada das tíbias

Após o término do experimento, as tíbias direitas dos animais foram removidas, desarticulando o fêmur do acetábulo do quadril. As tíbias foram dissecadas, e todo o tecido adjacente foi removido. Usou-se um paquímetro digital para medir o comprimento total da tíbia, para cada animal.

3.7 Avaliação funcional

3.7.1 Exame ecocardiográfico

Neste estudo, foi empregado o ecocardiograma para análise da morfologia e da função ventricular esquerda. Todos os exames foram conduzidos pelo mesmo observador, a Dr^a Nazareth Rocha. No tempo de análise de 5 meses, após o tratamento, uma semana antes da eutanásia, os animais dos diferentes grupos foram anestesiados com ketamina/xilazina (1 ml/g); em seguida, tricotomizados na região do tórax e posicionados em decúbito lateral esquerdo, permitindo a localização do transdutor entre os espaços intercostais do hemitórax esquerdo, objetivando a aquisição de imagens.

Para a realização do procedimento, foi utilizado um aparelho ecocardiográfico com Doppler (Esaote, modelo CarisPlus, Firenze-Italy), com transdutor de 10MHz. Para as medidas das estruturas cardíacas, foram obtidas imagens a partir dos cortes para-esternal longitudinal e transverso. Este último, ao nível do músculo papilar, nos modos bidimensional e unidimensional. Os seguintes parâmetros foram obtidos de acordo com o padrão da Sociedade Americana de Ecocardiografia e descrito por Sahn e colaboradores (98): diâmetro do átrio esquerdo em diástole (AE D), espessura do septo interventricular em diástole (septo D) e espessura da parede posterior em diástole (Pp D), fração de ejeção (FE), diâmetro da aorta (A). O débito cardíaco esquerdo (DC) será determinado, multiplicando-se a integral de velocidade do fluxo aórtico pela área valvar aórtica e pela frequência cardíaca.

Para cada animal as medidas foram adquiridas em triplicatas, sendo, posteriormente, calculados os valores médios e realizados os testes estatísticos. As medidas estão representadas em tabela, sob a forma de média <u>+</u> erro padrão da média (EPM).

3.7.2 Exames físicos

Foi aferida a massa corporal dos animais semanalmente, iniciando uma semana antes do primeiro ciclo de quimioterapia do grupo TC+IR, até a semana da eutanásia. Especialmente para esta análise estatística foram realizados os testes seguintes estatísticos: ANOVA para medidas repetidas, com o objetivo de identificar variações dentro do próprio grupo; e ANOVA com pós-teste de Holm-Sidak, para comparar os três grupos, em todas as semanas onde a massa corporal foi aferida

Foi mensurado o peso do coração em balança de precisão (Digipeso DP-3000, Denver Instrument AA- 160), em seguida o ventrículo esquerdo (VE) foi isolado. Ambos, coração e VE, foram pesados diretamente na balança, e também pelo método de Scherle, para a obtenção do volume. Relações como massa coração/massa corporal, massa VE/massa do coração foram feitas. Foi realizada também a normalização da massa do coração e do VE pelo comprimento da tíbia, de cada animal.

3.8 Ensaios moleculares

Os ensaios moleculares foram realizados através da técnica de *quantitative real time Reverse transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-qPCR). Esta é uma técnica quantitativa, que pode auxiliar na compreensão de vários processos fisiológicos, devido à sua grande sensibilidade para detectar produtos transcritos em pequenas quantidades. Essa técnica foi utilizada para verificar se os níveis de mRNA de TGF-β1, procolágeno tipo I (Proc I), ECA, AT₁, angiotensinogênio (AngT), renina, Bax, bcl2 e VEGF estavam alterados no tecido cardíaco dos diferentes grupos. A RT-qPCR é realizada em diversas etapas, como será mostrado nas próximas secções.

3.8.1 Extração de RNA total

O ventrículo esquerdo do coração dos ratos foi lavado com 0,9% NaCl (p/v), congelado em nitrogênio líquido e armazenado a –70°C. O RNA total de cada ventrículo foi extraído de 100mg do tecido congelado utilizando 1 mL de trizol (Invitrogen). As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 5 min a 27°C. Em seguida, centrifugadas a 12.000 xg por 10 min a 4°C para a retirada de partículas insolúveis (membrana celular, polissacarídeos e DNA de alto peso molecular). Os sobrenadantes foram transferidos para tubos estéreis de 1,5 mL e a esses foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio. Essa mistura foi homogeneizada por

inversão durante 30 segundos e mantidos por 5 min a 27°C. Depois, as amostras foram centrifugadas a 12.000 xg por 15 min a 4°C. A fase aquosa de cada extração foi transferida para tubos novos, aos quais foram adicionados 0,5 mL de isopropanol e incubados por 10 min a 27°C.

As amostras foram, então, centrifugadas durante 10 min em 12.000 xg a 4°C e os RNAs obtidos, lavados com etanol gelado 75%, diluído em água tratada com dietilpirocarbonato 0,1% (DEPC). Após a lavagem, os precipitados foram, de novo, centrifugados a 12.000 xg por 10 min a 4°C e, por fim, ressuspendidos em 20 μ L de água tratada com DEPC 0,1%. As concentrações foram estabelecidas por meio da densidade óptica a 260nm (Biophotometer).

3.8.2 Reação de transcriptase reversa

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

3.8.3 RT-qPCR: elaboração dos primers

Os iniciadores foram desenhados de acordo com instruções contidas no manual do *Power SYBR® Green PCR Master Mix and RT-PCR* (Applied Biosystems), com auxílio da ferramenta disponível *on-line* na página da IDT (*Integrated DNA Technologies* - www.idtdna.com/scitools/scitools.aspx). As sequências dos mRNAs foram obtidas no banco

de dados do genoma humano (www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide). A especificidades dos oligonucleotídeos foram determinadas previamente in silico diante de sua homologia a dados de mRNAs de rato. através da ferramenta BLAST Rat Sequences (www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/BlastGen/BlastGen.cgi?taxid=10116), realizando buscas de baixa expectativa. Os melhores iniciadores foram determinados, quando possuíam homologia (*Hits*), exclusivamente com seus alvos. A tabela 1 mostra o resumo dos iniciadores utilizados.

3.8.4 Avaliação dos amplicons e a RT-qPCR

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

Para análise da expressão gênica diferencial, em PCR em tempo real, foram realizadas reações, para curva padrão, dos genes analisados, variando a massa de cDNA em 15ng, 3ng, 0,6ng, 0,12ng, e 0,024ng em 20µL de reação que também possuía 0,8µM de cada oligo específicos (senso e anti-senso) e 1X GoTag® *qPCR Master Mix* (Promega). Para a determinação da quantidade de mRNA, nas diferentes condições experimentais, foram utilizados para cada reação 1ng ou 1,5ng de cDNA, 0,8 uM de cada oligonucleotídeo e GoTag® *qPCR Master Mix* (Promega) em 20uL de reação. Essas reações foram realizadas em quadruplicatas para cada condição experimental.

Nas reações para análise de PCR em tempo real, as amostras foram submetidas à incubação inicial no termociclador (7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems) de 50°C por 2 min seguidos por uma de 95°C por 10min e 50 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1min.

GENE	# ACESSO	5' – PRIMER – 3'	AMPLICON	
ALVO		F/R		
GAPDH	NM_017008	ATGATTCTACCCACGGCAAG/	135	
		CTGGAAGATGGTGATGGGTT		
$TGF-\beta_1$	NM_021578	ACAGCTCCAGGCACCGGAGA/	141	
		GCATGGTAGCCCTTGGGCTCG		
Proc I	NM_053304	CCAGTTCGAGTATGGAAGCGAAG/	132	
		CCATGTAGGCTACGCTGTTCTTG		
AngT	NIN 124422	CTACGTTCACTTCCAAGGGAAGA/		
	INIM_154452	CACAGACACTGAGGTGCTGTTG	90	
Renina	NM_012642	GGTGCCCTCCACCAAGTGT/	78	
		GCTAGAGGATTCGGAGGAGTCA		
ECA	NM_012544	GCACGACACCAACATCACGGA/	87	
		CTTGCCCCAGACCTCTGCAAACT		
AT_1	NM 020085	TCTCAGCTCTGCCACATTCCCTG/	104	
(Agtr1a)	INIM_030983	TGGTGATCACTTTCTGGGAGGGT	104	
Bax	NM_017059	CGATGAACTGGACAACAACATG/	84	
		CCACACGGAAGAAGACCTCT		
Bcl2	NM_016993	CCCACCGAACTCAAAGAAGG/	129	
		GCAGAGATGTCCAGTCAGC		
VEGF	NM_001110334	CCATGCCAAGTGGTCCCAGGC/	99	
		ACGGCAATAGCTGCGCTGGT		

Tabela 1. Iniciadores utilizados para análise da expressão diferencial com RT-q PCR.

Os resultados da PCR em tempo real foram analisados com auxílio do programa Opticon Monitor 2.03 (MJ Research). As massas dos produtos amplificadas de cada gene foram determinadas graças à interpolação dos resultados dos pontos experimentais com dados gerados pela curva padrão. Os dados de Ct (threshold cycle) de cada ponto experimental, nas suas diferentes condições, foram normalizados com padrão dos Cts do gene GAPDH (gene constitutivo). Uma vez normalizadas, as variações dos níveis de mRNA, correspondente a cada gene de interesse, foram determinadas em virtude da razão dos pontos experimentais, em comparação com as amostras controles. As fórmulas e as determinações para os cálculos do RT-qPCR estão disponíveis em Wong e Medrano (99).

3.9 Ensaios histológicos

Os ensaios histológicos foram realizados através de microscopia óptica, para tal foi utilizado processamento de rotina, que será descrito a seguir.

As amostras dos ventrículos esquerdos (VE) foram obtidas, utilizando o método "orientator", que consiste em sucessivos cortes aleatórios, uniformes e isotrópicos (100). Em seguida, as amostras foram fixadas em formol tamponado a 10% e, mais tarde, desidratados em séries crescentes de álcoois, diafanizados em xilol, incluídos em paraplast e seccionados em cortes de 5 µm de espessura. Parte das lâminas foi corada utilizando a técnica de hematoxilina-eosina, e estas foram usadas para a estereologia; parte foi corada pela técnica de Picrosirius red, onde se avaliou a estrutura microscópica do tecido; e outras lâminas não foram coradas, pois foram utilizadas para imunohistoquímica. As imagens digitais foram adquiridas usando a câmera microscópica de alta resolução Zeiss AXIOCAM HRc (Jena, Alemanha), acoplada ao microscópio Zeiss AXIO SCOPE A.1 (Jena, Alemanha).

3.9.1 Imunohistoquímica para o anticorpo Anti-CD31

A molécula CD31, também conhecida como PECAM-1, é uma das responsáveis pela adesão célula-célula, e está construtivamente expressa na superfície das células endoteliais. Foi realizada a imunohistoquímica para o anticorpo anti-CD31 com o objetivo de marcar as células endoteliais do tecido cardíaco, e assim tornar possível a visualização dos microvasos intracardíacos (101). Dessa forma a técnica de estereologia pôde ser realizada de forma mais precisa para a contagem dos vasos.

Os cortes de VE foram processados conforme citado no item 3.9, e não foram corados. As lâminas montadas primeiramente passaram pelo processo de desparafinização, que consiste na retirada da parafina (para que as soluções utilizadas posteriormente pudessem infiltrar-se no material), para isso ficaram por 30 minutos em estufa a 37°C e passaram por 3 banhos em xileno (por 2 minutos cada). Após a desparafinização, os cortes foram hidratados com banhos decrescentes (100%, 90% e 70%) de álcool etílico P.A. e água destilada (todos os banhos tiveram a duração de 2 minutos). Após o banho de água destilada, as lâminas foram transferidas para câmara úmida. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado por 15

minutos, através do peróxido de hidrogênio a 3%. A retirada do excesso de peróxido de hidrogênio a 3% foi realizada com 3 banhos em tampão PBS de 5 minutos cada. Foi realizada recuperação antigênica *overnight*, onde as lâminas ficaram imersas na solução tampão TRIS-EDTA pH 8,0 a 60°C. O excesso foi retirado através de 3 banhos em tampão PBS de 5 minutos cada. A reação das amostras com PBS/BSA a 3% por 20 minutos foi realizada para que ocorresse o bloqueio de sítios inespecíficos. Após este intervalo de tempo ocorreu a incubação da amostra com o anticorpo primário anti-CD31 (abcam®, ab28364, Cambridge, UK), diluído na proporção 1:50, em PBS/BSA a 1%, por 2 horas a 37°C. Após este período o excesso de anticorpo primário foi retirado com 3 banhos em tampão PBS, de 5 minutos cada. Seguidamente foi realizada a incubação do anticorpo secundário, conjugado com biotina (DAKO®, K400611, Califórnia, USA) durante 30 minutos, e retirado o excesso do anticorpo secundário através de 3 banhos em tampão PBS de 5 minutos cada.

A posterior incubação com streptavidina (DAKO®, K400611, Califórnia, USA), por 20 minutos, foi realizada para que essa conjugasse com a biotina do anticorpo secundário, e com isso amplificasse o sinal da reação antígeno-anticorpo. Passado esse intervalo o excesso de streptavidina foi retirado por lavagem única em tampão PBS. Após essa lavagem foi aplicado uma gota de DAB (DAKO®, K400611, Califórnia, USA), durante 20 segundos, para evidenciar a reação antígeno-anticorpo, tornando possível a visualização da mesma ao microscópio de luz. A reação com o DAB foi interrompida através da colocação das lâminas em água destilada. O material foi contra corado com hematoxilina por 1 minuto. Após a contra coloração as amostras foram desidratadas, diafanizadas e montadas com Entellan (Merck Millipore, MA, USA), e visualizadas com o equipamento descrito no item 3.8.

3.9.2 Estereologia

Esta técnica tem como objetivo quantificar parâmetros cardíacos que possam estar envolvidos no remodelamento cardíaco. Desta forma, para cada grupo foram analisados 5 animais, para cada animal 3 lâminas, e para cada lâmina, foram obtidas imagens digitais de 3 campos, de forma a permitir a análise estatística correta. As imagens digitais foram adquiridas no equipamento acima mencionado. Para o cálculo dos parâmetros estereológicos foi utilizada uma área teste, e um sistema de pontos, com 36 pontos. As análises foram realizadas online, através do sistema STEPanizer (www.stepanizer.com) (102). Os parâmetros estimados foram:

a densidade de volume, dos cardiomiócitos ($Vv_{[cmi]}$), dos vasos intramiocárdicos ($Vv_{[vaso]}$) e de tecido conjuntivo ($Vv_{[tc]}$); a densidade de comprimento dos vasos intramiocárdicos ($Lv_{[vaso]}$); e a área seccional média dos cardiomiócitos ($A_{[cmi]}$). Foi também estabelecida a relação de vasos por cardiomiócitos ($Vv_{[vaso]}/Vv_{[cmi]}$) (103). Os vasos foram primeiramente marcados por imunohistoquímica, conforme o item 3.8.1, para depois serem quantificados com maior precisão. As fórmulas utilizadas para os cálculos foram:

$$Q_{A} = \frac{n^{o} n \acute{u} cleos na \acute{a} rea teste}{\acute{a} rea teste (\mu m^{2})}$$
(1)

$$V_{V[cmi]} = \frac{P_p(miocito)}{P_T} \quad V_{V[vaso]} = \frac{P_p(vaso)}{P_T} \quad V_{V[tc]} = \frac{P_p(Tec. Conj.)}{P_T}$$
(2)

Onde,

P_{p(cmi)} = número de pontos que atingem os cardiomiócitos;

 $P_{p(vaso)} =$ número de pontos que atingem os vasos;

 $P_{p(tec. Conj.)} = n$ úmero de pontos que atingem o tecido conjuntivo;

 $P_T =$ número de pontos totais na área teste.

$$L_{V[vaso]} = 2 \times Q_{A[vaso]}$$
⁽³⁾

$$A_{[cmi]} = \frac{V_{V[cmi]}}{2Q_{A[cmi]}}$$
(4)

3.9.3 Coloração azul de toluidina

A coloração com o corante azul de toluidina evidencia os mastócitos. Esta célula contém, no seu citoplasma, numerosos e pequenos grânulos que armazenam grande quantidade de proteoheparina e histamina. A heparina, altamente sulfatada, é revelada pelo azul de toluidina produzindo o fenômeno da metacromasia (104).

Os cortes de VE foram processados conforme item 3.8, e para a coloração utilizou-se a técnica por azul de toluidina. Primeiramente as lâminas foram desparafinizadas em 3 banhos de xileno (por 2 minutos cada). Após a desparafinização, os cortes foram hidratados com banhos decrescentes (100%, 90% e 70%) de álcool etílico P.A. e água destilada (todos os banhos tiveram a duração de 2 minutos). As lâminas foram então incubadas em solução aquosa de azul de toluidina a 0,20% (Sigma-Aldrich, MA, USA), e acidificadas por 2-3 minutos até que o pH fosse de 2.3. As lâminas foram lavadas em água destilada, e rapidamente desidratadas em um banho de álcool 95%, e dois banhos de álcool 100% (30 segundos cada). As secções então foram diafanizadas em xileno, e montadas com Entellan (Merck Millipore, MA, USA). Os mastócitos adquiriram cor púrpura/violeta, e o fundo da lâmina permanece levemente azulado. As imagens foram obtidas conforme descrito no item 3.9.

3.10 Análise dos dados

Os dados foram expressos como a média e seu erro padrão associado (EPM). A homogeneidade das variâncias foi confirmada através do teste de Bartlett. As diferenças entre os grupos foram analisadas através do teste one-way ANOVA, com teste post-hoc de Tukey. Valores de $P \le 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. As análises foram realizadas através do programa GraphPad Prism, versão 6.01 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA).

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação funcional

A avaliação funcional do coração foi realizada através da ecocardiografia. O objetivo deste exame foi avaliar parâmetros cardíacos que pudessem estar relacionados a disfunções causadas pelos tratamentos de RT e/ou QT. A tabela 2 mostra os valores obtidos para os parâmetros mensurados no exame.

Tabela 2. Parâmetros obtidos através de Ecocardiografia

		GRUPOS		
Parâmetros	Controle	TC+IR	IR	Valor p
AE D (cm)	$0,\!3586 \pm 0,\!0098$	$0,3444 \pm 0,0130$	$0,\!3283 \pm 0,\!0230$	0,2301
Septo D (cm)	$0,\!1438 \pm 0,\!0032$	$0,1378 \pm 0,0059$	$0,1683 \pm 0,0187$	0,5261
Pp D (cm)	$0,\!1438 \pm 0,\!0032$	$0,1333 \pm 0,0033$	$0,1567 \pm 0,0123$	0,3821
A (cm)	$0,3214 \pm 0,0073$	$0,2922 \pm 0,0114$	$0,3100 \pm 0,0146$	0,3393
FEVE (%)	$93{,}20\pm0{,}80$	$80,20 \pm 1,93$	$91,83 \pm 1,40$	0,0002
DC (L/min)	$0,0637 \pm 0,0042$	$0,0244 \pm 0,0029$	$0,\!0500\pm0,\!0052$	0,0006

Valores expressos em Média \pm EPM. AE D = diâmetro do átrio esquerdo em diástole; Septo D= espessura do septo em diástole; Pp D = espessura da parede posterior em dástole; A = diâmetro da aorta; FEVE = fração de ejeção do ventrículo esquerdo; DC = débito cardíaco.

Foi então realizada a análise estatística dos dados obtidos no exame de ecocardiografia. As figuras 4 e 5 mostram o gráfico dos parâmetros FEVE (%) e Débito cardíaco (L/min), respectivamente.

Nota-se que tanto a fração de ejeção, quanto o débito cardíaco estão reduzidos nos animais que receberam quimioterapia e radioterapia concomitantemente. Houve uma redução de aproximadamente 14% da FEVE do grupo TC+IR, quando comparado com o controle, e de aproximadamente 62% do DC no mesmo grupo.



Figura 4. Fração de ejeção do ventrículo esquerdo, obtida por ecocardiografia, dos animais dos grupos controle, TC+IR e IR. As barras de erro representam o EPM. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p \le 0.05$. (***) = $p \le 0.001$.



Figura 5. Débito cardíaco, obtido por ecocardiografia, dos animais dos grupos controle, TC+IR e IR. As barras de erro representam o EPM. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p \le 0.05$. (***) = $p \le 0.001$.

4.2 Exames físicos

4.2.1 Massa corporal

As massas corporais dos animais dos grupos controle, TC+IR e IR foram semanalmente aferidas. A figura 6 mostra a evolução das massas desde antes do início do tratamento, semana 0, até a última semana, semana 20, no dia da eutanásia. Cabe ressaltar que apenas os animais do grupo TC+IR receberam os quatro ciclos de QT.



Figura 6. Acompanhamento das massas corporais dos animais dos grupos controle, TC+IR e IR. Nas semanas 1QT, 2QT, 3QT e 4QT apenas os animais do grupo TC+IR receberam quimioterapia. As barras de erro representam o EPM. O * significa diferença estatística em relação ao controle. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p \le 0.05$. (*) = $p \le 0.05$; (**) = $p \le 0.01$; (***) = $p \le 0.001$.

Nota-se que a partir do quarto ciclo de quimioterapia os animais do grupo TC+IR apresentam massa corporal significativamente inferior a do controle. De fato, durante as semanas onde o quimioterápico foi administrado, os animais estavam indispostos, emagrecidos e apresentaram discreta diarréia. Durante este período 2 animais faleceram, e mais 3 faleceram nas semanas seguintes (1, 3 e 4 meses após o fim do trataemneto). A fim de

manter o mesmo número de animais em todos os grupos, estes que faleceram não foram contabilizados em nenhuma análise estatística, mantendo assim 7 animais por grupo.

4.2.2 Massa do coração e do VE

Foram obtidas as massas do coração e do VE de cada animal. As massas foram posteriormente normalizadas pelo comprimento da tíbia. Estudos anteriores mostram que a normalização do comprimento da tíbia correlaciona-se melhor com as massas do coração e do VE que a massa corporal (105-107). As figuras 7 e 8 mostram o resultado desta correlação para o coração e para o VE, respectivamente.



Figura 7. Massa do coração normalizada pelo comprimento da tíbia nos grupos: controle, TC+IR e IR. As barras de erro representam o EPM. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p \le 0.05$. (*) = $p \le 0.05$; (**) = $p \le 0.01$.



Figura 8. Massa do ventrículo esquerdo (VE) normalizada pelo comprimento da tíbia nos grupos: controle, TC+IR e IR. As barras de erro representam o EPM. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p \le 0.05$. (*) = $p \le 0.05$; (**) = $p \le 0.01$.

Através das figuras 7 e 8 pode-se observar que tanto a massa do coração quanto a massa apenas do VE estavam significativamente menores no grupo TC+IR, quando comparadas com os grupos controle e IR.

4.3 Resultados dos ensaios moleculares

Os ensaios moleculares foram obtidos através da técnica de RT-qPCR em tempo Real. Esta técnica tem a vantagem de ser quantitativa, sensível e precisa.

4.3.1 <u>Avaliação molecular dos níveis de expressão de TGF- β₁ e procolágeno tipo I (Proc I).</u>

Como visto na introdução, a cardiotoxicidade causada através da ação de quimioterápicos e irradiação para o tratamento do CM muitas vezes leva à fibrose cardíaca no decorrer dos anos. Por isso, resolveu-se estudar a participação da citocina TGF- β_1 e de Proc I, fortes candidatos moleculares, envolvidos no processo de fibrose. As figuras 9 e 10 mostram

os resultados obtidos para a diferença de expressão nos níveis de mRNA de TGF- β_1 e de Proc I, respectivamente.



Figura 9. Diferença no nível de expressão de mRNA de TGF- β_1 no ventrículo esquerdo dos ratos dos grupos controle, TC+IR e IR. As barras de erro representam o EPM. Foram considerados estatisticamente significativos valores de p $\leq 0,05$ (*).



Figura 10. Diferença no nível de expressão de mRNA de Procolágeno tipo I no ventrículo esquerdo dos ratos dos grupos controle, TC+IR e IR. As barras de erro representam o EPM. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p \le 0.05$. (**) = $p \le 0.01$.

As análises estatísticas dos dados de RT-qPCR para TGF- β_1 e de Proc I mostram que, em ambos os casos, níveis de expressão destes componentes estão significativamente aumentados no grupo TC+IR, quando comparados com o controle. No caso da citocina TGF- β_1 , houve aumento significativo também do grupo IR em relação ao grupo controle. Embora não tenha sido encontrada diferença significativa entre o grupo IR e controle para os níveis de mRNA de Proc I, nota-se uma forte tendência de aumento.

4.3.2 Avaliação molecular dos níveis de expressão de componentes do RAS e do VEGF

Depois de observado o aumento de TGF- β_1 e de Proc I, sugerindo a ocorrência de um processo de fibrose, foi investigada a participação de componentes do sistema reninaangiotensina neste evento. Para isso, averiguou-se o nível de mRNA, do angiotensinogênio, da renina, da ECA e do receptor AT₁, através da técnica de RT-qPCR em tempo real. As figuras 11-14 mostram os gráficos obtidos a partir destes resultados.



Figura 11. Diferença no nível de expressão de mRNA de Angiotensinogênio no ventrículo esquerdo dos ratos dos grupos controle, TC+IR e IR. As barras de erro representam o EPM.



Figura 12. Diferença no nível de expressão de mRNA de Renina no ventrículo esquerdo dos ratos dos grupos controle, TC+IR e IR. ND = não detectado. As barras de erro representam o EPM.



Figura 13. Diferença no nível de expressão de mRNA da enzima conversora de angiotensina (ECA) no ventrículo esquerdo dos ratos dos grupos controle, TC+IR e IR. As barras de erro representam o EPM. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p \le 0,05$. (***) = $p \le 0,001$.



Figura 14. Diferença no nível de expressão de mRNA do receptor de angiotensina tipo 1 (AT₁) no ventrículo esquerdo dos ratos dos grupos controle, TC+IR e IR. As barras de erro representam o EPM. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p \le 0,05$. (*) = $p \le 0,01$ e (**) = $p \le 0,01$.

Através dos resultados obtidos, nota-se que não há diferença significativa nos níveis de mRNA de angiotensinogênio entre os grupos, embora este esteja elevado no grupo TC+IR. Observa-se também que a renina não está expressa no grupo controle, apenas nos grupos tratados TC+IR e IR. A expressão da ECA também foi avaliada, e mostrou-se significativamente diminuída nos grupos tratados, assim como a expressão de AT₁. Sabe-se que a ECA é principalmente, e muitas vezes unicamente, produzida por células endoteliais, e que a irradiação afeta primeiramente estas células, causando apoptose das mesmas (108). Por esta razão decidiu-se investigar os níveis de expressão do VEGF, por ser um fator angiogênico amplamente estudado, com o objetivo de associá-lo à diminuição da ECA. A figura 15 mostra os níveis de expressão relativos do VEGF, obtidos por RT-qPCR em tempo real.



Figura 15. Diferença no nível de expressão de mRNA do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) no ventrículo esquerdo dos ratos dos grupos controle, TC+IR e IR. As barras de erro representam o EPM. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p \le 0.05$. (***) = $p \le 0.01$.

A figura 14 mostra que os perfis dos resultados do nível de expressão de VEGF e de ECA, na figura 13, são muito semelhantes. O VEGF também está significativamente diminuído nos animais dos grupos tratados, quando comparado com o controle.

4.3.3 Avaliação molecular dos níveis de expressão de Bax e bcl2

Como visto na secção 1.5.5, as proteínas Bax e bcl2 estão envolvidas no processo de apoptose, e seus níveis moleculares podem ser associados à disfunção cardíaca induzida pelos tratamentos de QT e/ou RT. A figura 16 mostra a diferença de expressão dos níveis da razão Bax/blc2 no ventrículo esquerdo dos animais dos grupos controle, TC+IR e IR.



Figura 16. Diferença no nível de expressão de mRNA da razão Bax/bcl2, no ventrículo esquerdo dos ratos dos grupos controle, TC+IR e IR. As barras de erro representam o EPM. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p \le 0.05$ (*).

Os resultados desta avaliação mostram que a razão dos níveis de expressão do mRNA da Bax/bcl2 é significativamente maior no grupo TC+IR, quando comparada com o controle. Quanto maior a razão Bax/bcl2, maior a proporção de Bax, com função pró-apoptótica, em relação à bcl2, com função anti-apoptótica.

4.4 Resultados dos ensaios histológicos

Através do exame de ecocardiografia, em conjunto com os ensaios por RT-qPCR em tempo real, algumas alterações funcionais moleculares foram observadas nos grupos tratados. Para auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos nestas alterações, foram realizados os ensaios histológicos.

Esta técnica foi utilizada com o objetivo de marcar os vasos e microvasos presentes no tecido cardíaco, para auxiliar na posterior contagem por estereologia. Para a quantificação dos vasos, assim como de todos os outros parâmetros envolvidos na estereologia, foi utilizado o programa STEPanizer, conforme explicado anteriormente no item 3.9.2. A figura 17 mostra o exemplo do uso deste programa para a contagem de vasos. Nesta imagem, observa-se a área teste, com 36 pontos, e também as linhas proibidas (linhas contínuas) e as linhas onde a contagem é considerada (linhas tracejadas). A figura 18 mostra a imunomarcação obtida para o anticorpo anti-CD31, nos grupos controle, TC+IR e IR.



Figura 17. Imagem obtida no programa STEPanizer, para a realização da contagem dos parâmetros estereológicos.



Figura 18. Imagens obtidas por microscopia óptica, do tecido do VE dos animais, através da técnica de imunohistoquímica para anticorpo anti-CD31. Os vasos e microvasos miocárdicos estão imunomarcados em marrom. A) Grupo controle; B) Grupo TC+IR; c) Grupo IR. As setas indicam exemplos de marcações.

A técnica de estereologia permitiu a quantificação de estruturas importantes para explicar o mecanismo de cardiotoxicidade induzida pelo tratamento do CM. As figuras 19 e 20 mostram a densidade de volume de cardiomiócitos ($V_{V[cmi]}$), a área seccional média dos cardiomiócitos ($A_{[cmi]}$), no VE, respectivamente.



Figura 19. Densidade de volume dos cardiomiócitos do VE dos animais dos grupos controle, TC+IR e IR. As barras de erro representam o EPM. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p \le 0.05$. (***) = $p \le 0.001$.



Figura 20. Área seccional média dos cardiomiócitos do VE dos animais dos grupos controle, TC+IR e IR. As barras de erro representam o EPM. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p \le 0.05$. (**) = $p \le 0.01$.

Observando estes resultados é possível notar que nos grupos tratados o número de cardiomiócitos é menor, e sua área seccional média é maior, quando comparado com o grupo controle.

Para verificar a vascularização do tecido cardíaco, quantificou-se a densidade de comprimento $(L_{V[vaso]})$ e de volume $(V_{V[vaso]})$ dos microvasos intramiocárdicos. Estes resultados estão apresentados nas figuras 21 e 22, respectivamente.

Através destes resultados nota-se que há diminuição na vascularização cardíaca dos animais dos grupos que receberam QT e/ou RT, em relação ao grupo controle. Para o suprimento sanguíneo aos cardiomiócitos, foi quantificada a densidade de microvasos por cardiomiócitos ($V_{V[vaso]}/V_{V[cmi]}$) de todos os grupos estudados, conforme mostra a figura 23.



Figura 21. Densidade de comprimento dos microvasos intramiocárdicos do VE dos animais dos grupos controle, TC+IR e IR. As barras de erro representam o EPM. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p \le 0.05$. (***) = $p \le 0.001$.



Figura 22. Densidade volume dos microvasos intramiocárdicos do VE dos animais dos grupos controle, TC+IR e IR. As barras de erro representam o EPM. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p \le 0.05$. (**) = $p \le 0.01$; (***) = $p \le 0.001$.



Figura 23. Densidade de volume dos microvasos intramiocárdicos por cardiomiócitos do VE dos animais dos grupos controle, TC+IR e IR. As barras de erro representam o EPM. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p \le 0,05$. (*) = $p \le 0,05$ (**) = $p \le 0,01$.

Conforme visto na figura 23, a densidade de microvasos intramiocárdicos por cardiomiócitos é menor nos grupos TC+IR e IR, quando comparado com o controle. Além destes parâmetros, também foi quantificada a densidade de volume de tecido conjuntivo $(V_{V[tc]})$ no VE dos animais, apresentado na figura 24. O resultado desta última quantificação mostra que ocorre o aumento significativo da densidade de tecido conjuntivo nos animais dos grupos tratados, em relação ao grupo controle.



Figura 24. Densidade volume de Tecido Conjuntivo no VE dos animais dos grupos controle, TC+IR e IR. As barras de erro representam o EPM. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p \le 0.05$. (***) = $p \le 0.001$ (**).

4.4.3 Avaliação estrutural do tecido cardíaco

Através da técnica de microscopia óptica foi avaliada a estrutura do tecido do VE dos animais dos grupos controle, TC+IR e IR. Esta avaliação foi feita usando cortes do tecido corados com picrosirius red modificado, para que as imagens pudessem ser observadas sem luz polarizada. Neste tipo de coloração as fibrilas e fibras colágenas se coram em vermelho e os núcleos, em roxo.

A figura 25 mostra imagens obtidas com objetivas de 40x e de 100x (a óleo) do tecido do VE dos animais dos grupos controle, TC+IR e IR. Observando as imagens é possível notar que a área seccional dos cardiomiócitos dos grupos tratados com QT e/ou RT é maior que a do controle, e que nestes grupos o tecido está desorganizado. Estes achados corroboram com os resultados obtidos na estereologia (figura 19). Além disso, nota-se vacuolização citoplasmática nos animais tratados.



Figura 25. Imagem obtida por microscopia óptica de tecido do VE corado com a técnica de picrosirius red. A e B) Grupo controle, objetiva de 40x e de 100x; C e D) Grupo TC+IR, objetiva de 40x e de 100x; E e F) Grupo IR, objetiva de 40x e de 100x. Os círculos evidenciam os cardiomiócitos, e as setas mostram vacuolização do citoplasma.

A figura 26 mostra a presença de fibrose, em vermelho, ao redor dos vasos. As imagens foram obtidas do VE dos animais, através de lâminas coradas com picro Sirius red, com magnificação de 100x (a óleo).



Figura 26. Imagens obtidas por microscopia óptica, de vasos no tecido do VE corado com picrosirius red, com objetiva de 100x (a óleo). Em vermelho, as fibras colágenas. A) Grupo controle; B) Grupo TC+IR; C) Grupo IR.

A imagem mostrada na figura 26 evidencia a presença de tecido conjuntivo em torno dos vasos, nos animais dos grupos TC+IR e IR. De uma forma geral, nota-se através da observação das lâminas no microscópio, que os grupos tratados apresentam mais tecido conjuntivo, não somente ao redor dos vasos, mas também intersticial. A maior presença de tecido conjuntivo nos grupos tratados, conforme mostra a figura 26, corrobora com os resultados da maior densidade de tecido conjuntivo (figura 23), nestes mesmos grupos, obtidos por estereologia.

4.4.4 Presença de mastócitos

Como visto na figura 11, através da análise molecular de RT-qPCR em tempo real, os níveis de expressão de mRNA de renina no VE dos animais do grupo controle eram insignificantes ou nulos. Porém a renina se mostrou expressa nos animais tratados. Para melhor compreender estes achados, foi realizada uma coloração de Azul de Toluidina, a fim de localizar mastócitos no tecido cardíacos dos animais de todos os grupos estudados. Sabe-se que o mastócito pode estar presente na injúria cardíaca, e que eles são importante fonte de renina (108).

A figura 27 mostra as imagens obtidas com a coloração azul de toluidina. Os mastócitos estão corados em púrpura, e indicados por setas. Foi apenas realizada análise qualitativa das lâminas coradas por esta técnica. Não foram observados mastócitos no tecido dos animais do grupo controle, apenas nos grupos tratados.



Fig. 27 Imagens obtidas, através de microscopia óptica com objetiva de 60x, do VE dos animais, corado com azul de toluidina. As setas indicam os mastócitos. A) grupo controle; B) Grupo TC+IR; C) Grupo IR

5. DISCUSSÃO

Os métodos para detecção e tratamento de diferentes tipos de câncer se desenvolveram muito nos últimos 20 anos. Hoje, a expectativa de sobrevida de 10 anos ocorre para 70% dos sobreviventes ao CM, e uma das complicações tardias do tratamento para esta doença, que envolve o tratamento com a quimioterapia e/ou radioterapia, é a cardiotoxicidade. O termo cardiotoxicidade abrange uma série de efeitos colaterais, que incluem arritmias, alterações na pressão arterial, isquemia do miocárdio, trombose ou insuficiência cardíaca. De fato, dados recentes sugerem que mulheres sobreviventes ao CM são mais propensas a morrer de doença cardíaca do que de câncer. É por isso fundamental entender as causas desta complicação para o sucesso do tratamento do paciente (45, 109, 110).

A disfunção miocárdica induzida por agentes antineoplásicos e irradiação, é uma área que evolui rapidamente e é o foco do presente estudo. Durante várias décadas, o problema era quase exclusivamente associado aos antracíclicos, onde o dano cardíaco era relacionado à dose acumulada, limitando seu uso. Apesar de muitos esforços estarem sendo direcionados para predição de risco de cardiotoxicidade, até o momento não existe consenso sobre as estratégias para prevenir e controlar a este efeito tardio induzido pelo tratamento do câncer. A pouca compreensão das bases moleculares envolvidas na cardiotoxicidade dificulta ainda mais sua detecção precoce, durante o tratamento do paciente (45, 111).

Neste estudo, foi desenvolvido um modelo animal, usando ratas Wistar submetidas a 4 ciclos de quimioterapia, e/ou irradiação, mimetizando um tratamento padrão do CM em mulheres. O principal objetivo foi avaliar as alterações cardíacas tardias induzidas por estes tratamentos.

A hipótese sugerida pelo nosso grupo, para explicar estas alterações, é que os tratamentos QT e RT, associados ou não, causem primeiramente lesões nos vasos intramiocárdicos. Dessa forma, o suprimento sanguíneo aos cardiomiócitos seria prejudicado, levando-os à morte celular ao longo do tempo. O tecido cardíaco saudável seria então substituído por tecido fibroso, levando à disfunção cardíaca tardia. Portanto, para testarmos essa hipótese associamos técnicas histológicas e moleculares, a técnicas onde a função cardíaca poderia ser avaliada.

De fato, o dano endotelial parece ser o mecanismo principal no desenvolvimento da cardiotoxicidade induzida por QT e RT. Estudos sugerem que agentes que previnem a
apoptose de células endoteliais possam proporcionar efeitos protetores desta toxicidade (35). Em nossa pesquisa, observamos através da estereologia que, nos grupos tratados com QT e/ou RT, houve uma diminuição significativa da densidade de volume microvasos cardíacos. E ainda através desta técnica, observou-se que a densidade de volume de cardiomiócitos também era menor, nos mesmos grupos, quando comparado com o controle, porém a área seccional média destas células era maior nesses grupos. Ademais, os ensaios moleculares por RT-qPCR do VEGF mostram uma diminuição deste fator nos grupos TC+IR e IR, em relação ao controle. Sabe-se que a sinalização de VEGF desempenha um papel importante para a manutenção da estrutura e viabilidade das células endoteliais.

O VEGF promove a sobrevivência de células endoteliais e, inversamente, sua inibição leva à apoptose destas células e ao remodelamento crônica dos leitos capilares, um processo conhecido como rarefação capilar (112). Além disso, a relação entre densidade de vasos por cardiomiócitos era menor nos grupos tratados, sugerindo que houve apoptose de cardiomiócitos por diminuição aporte de nutrientes, e que os cardiomiócitos restantes sofreram uma hipertrofia compensatória. Corroborando com estes achados, através da microscopia óptica, mostrou-se que os cardiomiócitos dos tecidos do VE dos grupos TC+IR e IR eram maiores que aqueles do grupo controle, além da estrutura do VE destes grupos estar desorganizada, apresentando ainda áreas com vacuolização citoplasmática. A presença dos vacúolos citoplasmáticos já foi evidenciada anteriormente, em animais tratados com doxorrubicina, um quimioterápico potencialmente cardiotóxico. A vacuolização dos cardiomiócitos pode estar relacionada à falência do sistema microtubular, e subsequente alteração da arquitetura citoesquelética, comprometendo a contratilidade do tecido (113, 114).

Ratificando nossos resultados, trabalhos anteriores indicam o importante papel da lesão vascular e disfunção endotelial na patogênese da injúria cardíaca induzida apenas pela radiação (115). A disfunção endotelial pode contribuir para a ativação de agentes prófibróticos e pró-inflamatórios, no tecido sadio irradiado. Embora o papel da disfunção endotelial em RIHD não tenha sido até o presente momento, estudado em detalhe, estudos experimentais em ratos associam a RIHD com a diminuição da densidade capilar do miocárdio (116). Assim, a lesão microvascular e a consequente lesão isquêmica local são considerados alguns dos mecanismos envolvidos na RIHD (50). Ainda, outros demonstraram que vários agentes quimioterápicos, tais como o docetaxel e ciclofosfamida, têm uma atividade anti-angiogênica, através do aumento da apoptose de células endoteliais e diminuindo a expressão dos níveis de VEGF (115, 117, 118) Um trabalho experimental desenvolvido por Fajardo e Stewart, em coelhos irradiados, demonstrou que a degeneração do miocárdio desenvolve-se através da redução na densidade de capilares, ocasionando áreas de isquemia, levando à morte dos cardiomiócitos e, subsequente fibrose (119, 120). A lesão vascular induzida por radiação, e a disfunção endotelial são mediadas, em parte, pelo TGF- β_1 . Estudos anteriores demonstraram uma superexpressão cardíaca de TGF- β_1 , em modelos de rato com RIHD, após a irradiação localizada no coração com 20Gy (50). Por esta razão esta citocina também foi objeto de estudo desta pesquisa, através da técnica de RT-qPCR em tempo real. Nos grupos tratados com QT e/ou RT ocorreu um aumento nos níveis de expressão do mRNA de TGF- β_1 , no VE. Além disso, houve um aumento dos níveis de mRNA prócolageno tipo I nos mesmos animais. Complementar a estes resultados, porém através da estereologia, mostramos um aumento da densidade de tecido conjuntivo nos mesmos grupos, quando comparado com o grupo controle.

Os resultados da aferição da massa do VE, normalizada pelo comprimento da tíbia, evidenciaram uma diminuição nos animais do grupo TC+IR, sugerindo que o tecido do VE possa ter se contraído devido à substituição de tecido sadio por tecido fibroso. Em conjunto, estes resultados indicam que o coração esteja em um processo de remodelamento. O conceito de remodelamento cardíaco implica na mistura de isquemia miocárdica e aumento do estresse na parede do coração durante a diástole, que resulta em alterações moleculares, celulares e intersticiais neste órgão (121). Morfologicamente, o elemento-chave da remodelação é a hipertrofia dos cardiomiócitos, a perda de cardiomiócitos a partir de necrose ou apoptose, e o crescimento das células intersticiais, especialmente proliferação de fibroblastos do miocárdio conduzindo à fibrose (112)

Os resultados encontrados na literatura corroboram com os nossos. Estudos anteriores indicam que o TGF- β_1 aumenta a produção de colágeno intersticial, de fibronectina e de proteoglicanos através dos miofibroblastos cardíacos. Além disso, ele estimula a sua própria produção nos miofibroblastos, estabelecendo assim um ciclo autócrino de diferenciação e ativação de miofibroblastos (72). Estudos demonstraram que a superexpressão de TGF- β_1 , em ratos transgênicos pode levar a hipertrofia cardíaca, caracterizada pela fibrose intersticial (122). Pacientes que sofrem de cardiomiopatia hipertrófica e cardiomiopatia dilatada idiopática, também apresentam níveis elevados de TGF- β_1 no VE e hipertrofia de cardiomiócitos (123) . A lesão miocárdica é marcada pela presença de fibrose intersticial difusa. Em nível microscópico, neste tipo de lesão, a deposição de colágeno aumenta como um todo, alterando a conformidade do miocárdio, e assim, contribuindo para a disfunção cardíaca (120).

Outro resultado encontrado neste estudo, através da técnica de RT-qPCR em tempo real, foi o aumento dos níveis de expressão da razão bax/bcl2 nos grupos TC+IR e IR, quando comparado com o controle. Pesquisas anteriores ressaltam o aumento da expressão desta mesma razão, em cardiomiócitos, associados ao infarto do miocárdio (124). Enquanto que, em pacientes com cardiomiopatia dilatada, onde a perda de cardiomiócitos é uma causa importante da lesão, a apoptose apresenta-se estritamente associada à razão Bax/bcl-2 (125) Portanto, a razão entre estas proteínas pró e anti-apoptóticas tem sido considerada como um importante marcador da probabilidade de sobrevivência das células do miocárdio.

Uma das limitações deste resultado é que a expressão do mRNA de Bax e bcl2 foi avaliado no VE como um todo, logo não é possível afirmar que suas expressões estão alteradas apenas no cardiomiócito, como esperado. Portanto, como sugestão futura, será realizada a técnica de apoptose por TÚNEL para confirmar estes resultados.

Além destes fenômenos, também foi avaliada nesta pesquisa a participação dos componentes do SRA no desenvolvimento da toxicidade cardíaca induzida pelo tratamento do CM. Nossos resultados mostraram que não houve alteração significativa da expressão de angiotensinogênio entre os grupos. Na literatura a regulação da expressão do angiotensinogênio é controversa (76). Não há evidências que mostrem a correlação entre a sua expressão e os tratamentos por radiação ou quimioterapia. Curiosamente, identificamos que a renina não foi expressa no tecido cardíaco do grupo controle, sadio, mas sua expressão foi fortemente induzida pelos tratamentos com TC + IR e IR. Estes achados são consistentes com estudos anteriores que mostram a presença de angiotensinogênio, produzido por cardiomiócitos e fibroblastos, no tecido cardíaco, mas a renina encontrada neste tecido não é por ele produzida, mas sim pelos rins (76, 126, 127).

Os mastócitos podem residir em vários órgãos e tecidos, incluindo o coração. Embora sejam mais conhecidos por seu papel nas reações de hipersensibilidade, os mastócitos estão também intimamente envolvidos na cicatrização e remodelação tecidual. Sabe-se que estas células podem sintetizar, armazenar, e secretar renina, sendo uma importante fonte desta enzima (128). O aumento no número de mastócitos é comumente encontrado na aterosclerose coronariana, na fibrose do miocárdio, e também em modelos animais de RIHD. Um estudo realizado por Boerma e Hauer-Jensen revelou a presença de mastócitos no tecido cardíaco, após a exposição à radiação localizada no coração, com dose única de 18Gy (50). Como no presente estudo detectou-se a presença de renina nos grupos tratados, sugeriu-se que esta poderia estar sendo produzida por mastócitos presentes no tecido. De modo a confirmar esta hipótese, foi realizada no nosso estudo a técnica de coloração por azul de toluidina para

visualizar a presença de mastócitos no tecido cardíaco. Foram encontrados mastócitos apenas nos grupos tratados, corroborando a hipótese de que essas células estão secretando renina no tecido cardíaco dos grupos tratados TC + IR e IR.

Também foi verificada, neste trabalho, a expressão de ECA, em tecido cardíaco, e os grupos tratados mostraram redução nos níveis de mRNA desta enzima, em comparação com o controle. Sabe-se que a ECA é principalmente, produzido pelas células endoteliais (129, 130), e que a irradiação afeta principalmente estas células, causando apoptose das mesmas, e subsequente diminuição na densidade capilar, como foi também relatado no nosso estudo (131-133). Portanto, estes achados em conjunto sugerem que a expressão de ECA local, no VE, esteja reduzida nos grupos que receberam QT e/ou RT, pois nestes mesmos grupos houve uma redução significativa da densidade vascular, ou seja, redução do número de células endoteliais, as principais secretoras de ECA.

Embora este resultado, à primeira vista, pareça controverso, pois os inibidores da ECA são uma das drogas mais indicadas, com efeitos comprovados, para RIHD, pouco se conhece sobre a complexidade do SRA. Hoje se sabe que a ECA é apenas uma das muitas enzimas que podem converter a ang I em ang II (134, 135). Estudos recentes sugerem que a quimase possa ser a enzima principal responsável por esta conversão no coração; e que os mastócitos parecem contribuir fortemente na geração local de ang II através da liberação desta enzima (136, 137). Além disso, no nosso estudo avaliamos apenas a ECA cardíaca, e não a ECA plasmática. A inibição desta última é a provável causa do sucesso do tratamento das complicações cardíacas induzidas por radio e quimioterapia, pois é consenso que a ECA está intensamente envolvida no remodelamento cardíaco (138).

Outro resultado obtido no presente estudo foi o aumento da expressão dos níveis de AT_1 nos grupos tratados com QT e/ou RT. Os receptores AT_1 estão expressos nos cardiomiócitos, fibroblastos, e recentemente descobriu-se que também estão expressos nos mastócitos cardíacos (139, 140). Diversos trabalhos mostram que estes receptores encontramse superexpressos no processo de remodelamento cardíaco após diversas condições patológicas (141, 142). A ligação de ang II ao receptor AT_1 , em fibroblastos, desencadeia uma resposta de hiperplasia, associada a um fenótipo secretor de colágeno. Scott e colaboradores corroboram essa hipótese e demonstram que a angiotensina II estimula a expressão de TGF- β_1 , em miofibroblastos cardíacos, por meio de receptores AT_1 .

Estes resultados obtidos mostraram alterações cardíacas moleculares e histológicas, porém é de suma importância relacionar estes resultados com alterações funcionais. Uma das definições de cardiotoxicidade do NCI é em termos da redução da FEVE. A FEVE é um dos mais importantes preditores de prognóstico, os pacientes com fração de ejeção substancialmente reduzidos normalmente têm pior prognóstico (35). Atualmente, uma série de considerações sobre custos e viabilidade sugere que a ecocardiografia desempenhe um papel importante para monitorar a toxicidade cardíaca induzida por agentes anticancerígenos. Esta técnica não invasiva permite avaliar as mudanças na função sistólica e diastólica (105, 143). Por isto, neste estudo, decidimos também realizar o exame ecocardiográfico, nos animais, uma semana antes da eutanásia. Notou-se uma redução de aproximadamente 14% na FEVE nos animais do grupo TC+IR, em relação ao controle. Porém não houve redução significativa do mesmo parâmetro entre o grupo IR e o controle.

Como descrito pela NCI, a redução de 10% na FEVE dos paciente já é considerada cardiotoxicidade de grau I (35), corroborando com os nossos resultados para identificar que os animais que receberam QT e/ou RT já manifestam alterações cardíacas funcionais compatíveis com as apresentadas por pacientes submetidos ao mesmo tratamento. Assim com redução da FEVE, os mesmos animais mostraram redução no débito cardíaco de 62% em relação ao controle. Este parâmetro mostra o volume de sangue ejetado por minuto no coração. Embora o débito cardíaco não seja um parâmetro considerado na definição de cardiotoxicidade, ele é importante para avaliar a função cardíaca, pois sua redução está relacionada ao pior prognóstico da insuficiência cardíaca (144).

Embora a avaliação FEVE, e de suas alterações precoces sejam um passo crucial no monitoramento deste tipo da toxicidade cardíaca, deve ser reconhecido que essas alterações são um achado tardio, que na maior parte das vezes é irreversível (143). Por este motivo, novas estratégias devem ser desenvolvidas a fim de predizer, com maior antecedência, quais pacientes em tratamento para o câncer são mais susceptíveis a desenvolver a cardiotoxicidade. Dentre as estratégias que podem auxiliar neste contexto está o uso de biomarcadores, como a troponina I, e mais recentemente o uso de inibidores de microRNA específicos envolvidos no processo de disfunção cardíaca (39, 145-147). Estes achados mostram que apenas o grupo que recebeu tratamento com quimioterapia associado à radioterapia, grupo TC+IR, apresentou alteração na função cardíaca. Uma possível explicação para este fato, é que a lesão provocada apenas pela a irradiação não causou danos suficientes, neste período avaliado (5 meses), para que a FEVE e o débito cardíacos estivessem reduzidos. Talvez, observando por períodos mais longos em ratos, os resultados poderiam ser diferentes, visto que a lesão RIHD pode levar até 20 anos para apresentar sintomas em pacientes.

Uma das questões que podem surgir neste trabalho é que o planejamento radioterápico passou por muitas melhorias ao longo das últimas décadas, chegando a modalidades como a Radioterapia de Intensidade Modulada (IMRT), que leva a exposições reduzidas de dose cardíaca durante o tratamento. No entanto, alguns autores recentes sugerem que os problemas referentes à cardiotoxicidade podem persistir. Publicações sobre o aumento da mortalidade cardiovascular em indivíduos expostos a doses relativamente baixas de radiação, tal como sobreviventes da bomba atômica ou técnicas de radiodiagnóstico, levantaram preocupações sobre o efeito cardíaco em longo prazo do tratamento do CM, mesmo utilizando as técnicas mais modernas de RT (148, 149).

Dessa forma, é importante ressaltar que não existem estudos que mostrem as bases histológicas e moleculares envolvidas na lesão cardíaca induzida pela associação de quimioterapia e radioterapia, tratamento padrão para pacientes com CM em estádio inicial. Neste contexto, o presente trabalho é inédito, e importante na determinação de novas estratégias que visem à melhora da qualidade de vida destas pacientes.

6. CONCLUSÃO

Como foi visto nesse trabalho, o CM é um problema de saúde mundial, e o número de novos casos cresce a cada ano. Por ser um tipo de câncer com bom prognóstico, as pacientes tratadas têm alta taxa de sobrevida, podendo desenvolver as complicações tardias associadas ao tratamento, como a cardiotoxicidade.

Trabalhos anteriores do nosso grupo já haviam mostrado que a irradiação na região torácica levava a alterações cardíacas moleculares e histológicas. Porém, a estratégia mais usada no tratamento do CM inclui, além da radioterapia, a quimioterapia. Então, este estudo teve como objetivo avaliar as alterações cardíacas tardias após a associação de ambos os tratamentos.

Analisando os resultados obtidos, em conjunto, podemos dizer que tanto a irradiação sozinha, quanto sua associação com a quimioterapia induzem o remodelamento cardíaco, que se inicia com a diminuição do número de vasos no tecido. Em conseqüência ocorre a morte dos cardiomiócitos, levando a substituição do tecido sadio por tecido fibroso. No grupo apenas irradiado, o período de 5 meses não foi suficiente para que os animais apresentassem diminuição da função cardíaca. Enquanto, no grupo que recebeu a irradiação associada à quimioterapia, o dano cardíaco causado pelos tratamentos em conjunto parece ser mais intenso, levando à diminuição da FEVE e do DC.

A área de cardioncologia é hoje uma especialidade muito recente, e também considerada uma necessidade para o sucesso do tratamento das pacientes com CM. O presente trabalho é inédito, e de extrema importância para o desenvolvimento de estratégias que considerem a cardiotoxicidade como parte da terapia contra o câncer.

REFERÊNCIAS

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2013;63(1):11-30.

2. Maxwell Parkin LMGF. Use of Statistics to Assess the Global Burden of Breast Cancer. The Breast Journal. 2006;12(1):10.

3. Ana Paula Roque da Silva CPN, Jéssica Luna de Oliveira Silva, Juliana Moreira de Oliveira Ferreira, Julio Fernando Pinto Oliveira, Marceli de Oliveira Santos, Marise Souto Rebelo, Rejane de Souza Reis, Suelen Rosales Vitorino da Silva. Estimativa 2012 : incidência de câncer no Brasil. CEDC, editor: INCA; 2011.

4. Singletary SE. Revision of the American Joint Committee on Cancer Staging System for Breast Cancer. Journal of Clinical Oncology. 2002;20(17):3628-36.

5. Singletary SE, Greene FL. Revision of breast cancer staging: The 6th edition of theTNM classification. Seminars in Surgical Oncology. 2003;21(1):53-9.

6. Fisher B, Bauer M, Margolese R, Poisson R, Pilch Y, Redmond C, et al. Five-Year Results of a Randomized Clinical Trial Comparing Total Mastectomy and Segmental Mastectomy with or without Radiation in the Treatment of Breast Cancer. New England Journal of Medicine. 1985;312(11):665-73.

7. Veronesi U, Saccozzi R, Del Vecchio M, Banfi A, Clemente C, De Lena M, et al. Comparing Radical Mastectomy with Quadrantectomy, Axillary Dissection, and Radiotherapy in Patients with Small Cancers of the Breast. New England Journal of Medicine. 1981;305(1):6-11.

8. Timothy Whelan ML, Andrew Willan, Amiram Gafni, Ken Sanders, Doug Mirsky, Shelley Chambers, Mary Ann O'Brien, Susan Reid, Sacha Dubois. Effect of a Decision Aid on Knowledge and Treatment Decision Making for Breast Cancer Surgery. A Randomized Trial. JAMA. 2004;292(4):7.

9. Tiezzi DG. Breast-conserving surgery for breast cancer. Rev Bras Ginecol Obstet. 2007;29(8):7.

10. Adamowicz K, Marczewska M, Jassem J. Combining systemic therapies with radiation in breast cancer. Cancer Treatment Reviews. 2009;35(5):409-16.

11. Arnal JF, Valera MC, Payrastre B, Lenfant F, Gourdy P. Structure-function relationship of estrogen receptors in cardiovascular pathophysiological models. Thromb Res. 2012;130 Suppl 1:S7-11.

12. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative G. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. The Lancet. 2011;378(9793):771-84.

13. Langlands FE, Horgan K, Dodwell DD, Smith L. Breast cancer subtypes: response to radiotherapy and potential radiosensitisation. Br J Radiol. 2013;86(1023):20120601.

14. Ward JF. The yield of DNA double-strand breaks produced intracellularly by ionizing radiation: a review. Int J Radiat Biol. 1990 Jun;57(6):1141-50.

15. Shuryak I, Brenner DJ. A model of interactions between radiation-induced oxidative stress, protein and DNA damage in Deinococcus radiodurans. J Theor Biol. 2009 Nov 21;261(2):305-17.

16. Jahan Z, Castelli S, Aversa G, Rufini S, Desideri A, Giovanetti A. Role of human topoisomerase IB on ionizing radiation induced damage. Biochem Bioph Res Co. 2013;432(3):545-8.

17. Dayes I, Rumble RB, Bowen J, Dixon P, Warde P. Intensity-modulated Radiotherapy in the Treatment of Breast Cancer. Clinical Oncology. 2012;24(7):488-98.

18. Tsang Y, Haviland J, Venables K, Yarnold J. The impact of dose heterogeneity on late normal tissue complication risk after hypofractionated whole breast radiotherapy. Radiotherapy and Oncology. 2012;104(2):143-7.

19. Ng A, Brock KK, Sharpe MB, Moseley JL, Craig T, Hodgson DC. Individualized 3D Reconstruction of Normal Tissue Dose for Patients With Long-term Follow-up: A Step Toward

Understanding Dose Risk for Late Toxicity. International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics. 2012;84(4):e557-e63.

20. Cosar R, Uzal C, Tokatli F, Denizli B, Saynak M, Turan N, et al. Postmastectomy irradiation in breast in breast cancer patients with T1-2 and 1-3 positive axillary lymph nodes: is there a role for radiation therapy? Radiat Oncol. 2011;6:28.

21. Vera-Badillo FE, Al-Mubarak M, Templeton AJ, Amir E. Benefit and Harms of New Anti-Cancer Drugs. Curr Oncol Rep. 2013 Feb 23.

22. Maughan KL, Lutterbie MA, Ham PS. Treatment of breast cancer. Am Fam Physician. 2010 Jun 1;81(11):1339-46.

23. Barrett-Lee PJ, Dixon JM, Farrell C, Jones A, Leonard R, Murray N, et al. Expert opinion on the use of anthracyclines in patients with advanced breast cancer at cardiac risk. Annals of Oncology. 2009;20(5):816-27.

24. Reid Hayward DSH. Doxorubicin Cardiotoxicity in the Rat: An In Vivo Characterization. Journal of the American Association for Laboratory Animal ScienceJournal of the American Association for Laboratory Animal Science. 2007;46(4):12.

25. Henderson IC. Can we abandon anthracyclines for early breast cancer patients? Oncology (Williston Park). 2011 Feb;25(2):115-24, 27.

26. Jones S, Holmes FA, O'Shaughnessy J, Blum JL, Vukelja SJ, McIntyre KJ, et al. Docetaxel With Cyclophosphamide Is Associated With an Overall Survival Benefit Compared With Doxorubicin and Cyclophosphamide: 7-Year Follow-Up of US Oncology Research Trial 9735. J Clin Oncol. 2009 Mar 10;27(8):1177-83.

27. Vikas Malhotra VJD, Alan P. Lyss, Clay M. Anderson, Steven Westgate, Michelle Reynolds, Barbara Barrett, Michael C. Perry. Neoadjuvant and Adjuvant Chemotherapy with Doxorubicin and Docetaxel in Locally Advanced Breast Cancer. Clinical Breast Cancer. 2004;5(5):8.

28. S Ward ES, S Davis, D Hind, A Rees, A Wilkinson. Taxanes for the adjuvant treatment of early breast cancer: systematic review and economic evaluation. Health Technology Assessment. 2007;11(40):139.

29. Souza MVNd. NOVOS PRODUTOS NATURAIS CAPAZES DE ATUAR NA ESTABILIZAÇÃO DE MICROTÚBULOS, UM IMPORTANTE ALVO NO COMBATE AO CÂNCER. Quim Nova. 2004;27(2):5.

30. John Crown MOL, Wei-Seong Ooi. Docetaxel and Paclitaxel in the treatment of breast cancer: a review of clinical experience. The Oncologist. 2004;9(suppl 2):9.

31. ULKA VAISHAMPAYAN REP, BHASKARA R. JASTI, MAHA HUSSAIN. TAXANES: AN OVERVIEW OF THE PHARMACOKINETICS AND PHARMACODYNAMICS. UROLOGY. 1999;54(suppl 6A):8.

32. Kondo N, Takahashi A, Ono K, Ohnishi T. DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways. J Nucleic Acids. 2010;2010:543531.

33. Chibber S, Hassan I, Farhan M, Salman M, Naseem I. White light augments chemotherapeutic potential of cyclophosphamide: an in vitro study. Biometals. 2013 Feb;26(1):23-31.

34. Munzone E, Curigliano G, Burstein HJ, Winer EP, Goldhirsch A. CMF revisited in the 21st century. Ann Oncol. 2012 Feb;23(2):305-11.

35. Albini A, Pennesi G, Donatelli F, Cammarota R, De Flora S, Noonan DM. Cardiotoxicity of anticancer drugs: the need for cardio-oncology and cardio-oncological prevention. J Natl Cancer Inst. 2010 Jan 6;102(1):14-25.

36. Brana I, Tabernero J. Cardiotoxicity. Ann Oncol. 2010 Oct;21 Suppl 7:vii173-9.

37. Albini A, Pennesi G, Donatelli F, Cammarota R, De Flora S, Noonan DM. Cardiotoxicity of Anticancer Drugs: The Need for Cardio-Oncology and Cardio-Oncological Prevention. JNCI Journal of the National Cancer Institute. 2009;102(1):14-25.

38. Seidman A, Hudis C, Pierri MK, Shak S, Paton V, Ashby M, et al. Cardiac dysfunction in the trastuzumab clinical trials experience. J Clin Oncol. 2002 Mar 1;20(5):1215-21.

39. Dolci A, Dominici R, Cardinale D, Sandri MT, Panteghini M. Biochemical markers for prediction of chemotherapy-induced cardiotoxicity: systematic review of the literature and recommendations for use. Am J Clin Pathol. 2008 Nov;130(5):688-95.

40. Pai VB, Nahata MC. Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents: incidence, treatment and prevention. Drug Saf. 2000 Apr;22(4):263-302.

41. Sawaya H, Sebag IA, Plana JC, Januzzi JL, Ky B, Cohen V, et al. Early Detection and Prediction of Cardiotoxicity in Chemotherapy-Treated Patients. The American Journal of Cardiology. 2011;107(9):1375-80.

42. Chargari C, Kirov KM, Bollet MA, Magne N, Vedrine L, Cremades S, et al. Cardiac toxicity in breast cancer patients: from a fractional point of view to a global assessment. Cancer Treat Rev. 2011 Jun;37(4):321-30.

43. Ewer MS, Swain SM, Cardinale D, Fadol A, Suter TM. Cardiac Dysfunction after Cancer Treatment. Texas Heart Institute Journal. 2011;38(3):248-52.

44. Bird BRJH, Swain SM. Cardiac Toxicity in Breast Cancer Survivors: Review of Potential Cardiac Problems. Clinical Cancer Research. 2008;14(1):14-24.

45. Raschi E, Vasina V, Ursino MG, Boriani G, Martoni A, De Ponti F. Anticancer drugs and cardiotoxicity: Insights and perspectives in the era of targeted therapy. Pharmacol Ther. 2010 Feb;125(2):196-218.

46. Braithwaite RS, Chlebowski RT, Lau J, George S, Hess R, Col NF. Meta-analysis of vascular and neoplastic events associated with tamoxifen. J Gen Intern Med. 2003 Nov;18(11):937-47.

47. Giordano SH, Hortobagyi GN. Local Recurrence or Cardiovascular Disease: Pay Now or Later. JNCI Journal of the National Cancer Institute. 2007;99(5):340-1.

48. Patt DA. Cardiac Morbidity of Adjuvant Radiotherapy for Breast Cancer. Journal of Clinical Oncology. 2005;23(30):7475-82.

49. Senkus-Konefka E, Jassem J. Cardiovascular effects of breast cancer radiotherapy. Cancer Treatment Reviews. 2007;33(6):578-93.

50. Boerma M, Hauer-Jensen M. Preclinical Research into Basic Mechanisms of Radiation-Induced Heart Disease. Cardiology Research and Practice. 2011;2011:1-8.

51. Giovanna Gagliardi IL, Lars Erik Rutqvist. Partial Irradiation of the Heart. Seminars in Radiation Oncology. 2001;11(3):10.

52. Eriksson F, Gagliardi G, Liedberg A, Lax I, Lee C, Levitt S, et al. Long-term cardiac mortality following radiation therapy for Hodgkin's disease: analysis with the relative seriality model. Radiother Oncol. 2000 May;55(2):153-62.

53. Yeh ETH, Bickford CL. Cardiovascular Complications of Cancer Therapy. Journal of the American College of Cardiology. 2009;53(24):2231-47.

54. McGale P, Darby SC, Hall P, Adolfsson J, Bengtsson N-O, Bennet AM, et al. Incidence of heart disease in 35,000 women treated with radiotherapy for breast cancer in Denmark and Sweden. Radiotherapy and Oncology. 2011;100(2):167-75.

55. Noel G, Mazeron JJ. [Favourable and unfavourable effects on long-term survival of radiotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials]. Cancer Radiother. 2001 Jan-Feb;5(1):92-4.

56. Hooning MJ, Botma A, Aleman BM, Baaijens MH, Bartelink H, Klijn JG, et al. Long-term risk of cardiovascular disease in 10-year survivors of breast cancer. J Natl Cancer Inst. 2007 Mar 7;99(5):365-75.

57. Kang YJ. Molecular and cellular mechanisms of cardiotoxicity. Environ Health Perspect. 2001 Mar;109 Suppl 1:27-34.

58. Azim HA, de Azambuja E, Colozza M, Bines J, Piccart MJ. Long-term toxic effects of adjuvant chemotherapy in breast cancer. Annals of Oncology. 2011;22(9):1939-47.

59. Pinder MC, Duan Z, Goodwin JS, Hortobagyi GN, Giordano SH. Congestive Heart Failure in Older Women Treated With Adjuvant Anthracycline Chemotherapy for Breast Cancer. Journal of Clinical Oncology. 2007;25(25):3808-15.

60. Casini S, Tan HL, Demirayak I, Remme CA, Amin AS, Scicluna BP, et al. Tubulin polymerization modifies cardiac sodium channel expression and gating. Cardiovasc Res. 2010 Mar 1;85(4):691-700.

61. R KF, Hajjar LA BF, PM H, P DMd, FRBG G, al. e. I Diretriz Brasileira de Cardio-Oncologia da Sociedade Brasileira de Cardiologia. Arq Bras Cardiol. 2011;96(2 supl.1):1-52.

62. Mandala M, Barni S, Prins M, Labianca R, Tondini C, Russo L, et al. Acquired and inherited risk factors for developing venous thromboembolism in cancer patients receiving adjuvant chemotherapy: a prospective trial. Ann Oncol. 2010 Apr;21(4):871-6.

63. Mukherjee SD, Swystun LL, Mackman N, Wang JG, Pond G, Levine MN, et al. Impact of chemotherapy on thrombin generation and on the protein C pathway in breast cancer patients. Pathophysiol Haemost Thromb. 2010;37(2-4):88-97.

64. Ferreira-Machado SC, Rocha Nde N, Mencalha AL, De Melo LD, Salata C, Ribeiro AF, et al. Upregulation of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor in irradiated rats. Int J Radiat Biol. 2010 Oct;86(10):880-7.

65. Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. Induction of Cardiac Fibrosis by Transforming Growth Factorβ1. Molecular Genetics and Metabolism. 2000;71(1-2):418-35.

66. Franck Verrecchia AM. Transforming growth factor-β and fibrosis. World Journal of Gastroenterology. 2007;13(22):7.

67. Massague J, Attisano L, Wrana JL. The TGF-beta family and its composite receptors. Trends Cell Biol. 1994 May;4(5):172-8.

68. Villarreal FJ, Dillmann WH. Cardiac hypertrophy-induced changes in mRNA levels for TGFbeta 1, fibronectin, and collagen. Am J Physiol. 1992 Jun;262(6 Pt 2):H1861-6.

69. Raaf L, Noll C, Cherifi Mel H, Samuel JL, Delcayre C, Delabar JM, et al. Myocardial fibrosis and TGFB expression in hyperhomocysteinemic rats. Mol Cell Biochem. 2011 Jan;347(1-2):63-70.

70. Hilbers FS, Boekel NB, van den Broek AJ, van Hien R, Cornelissen S, Aleman BM, et al. Genetic variants in TGFbeta-1 and PAI-1 as possible risk factors for cardiovascular disease after radiotherapy for breast cancer. Radiother Oncol. 2012 Jan;102(1):115-21.

71. Águila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Apfel MIR. Estereologia do Miocárdio de Ratos Jovens e Idosos. Arq Bras Cardiol. 1998;70(2):105-9.

72. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. J Pathol. 2008 Jan;214(2):199-210.

73. Yarnold J, Brotons MC. Pathogenetic mechanisms in radiation fibrosis. Radiother Oncol. 2010 Oct;97(1):149-61.

74. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. Nature. 2008 May 15;453(7193):314-21.

75. Barcellos-Hoff MH. How do tissues respond to damage at the cellular level? The role of cytokines in irradiated tissues. Radiat Res. 1998 Nov;150(5 Suppl):S109-20.

76. Cat AND, Touyz RM. A new look at the renin–angiotensin system—Focusing on the vascular system. Peptides. 2011;32(10):2141-50.

77. Yang R, Walther T, Gembardt F, Smolders I, Vanderheyden P, Albiston AL, et al. Renal vasoconstrictor and pressor responses to angiotensin IV in mice are AT1a-receptor mediated. J Hypertens. 2010 Mar;28(3):487-94.

78. Zhuo JL, Li XC. New insights and perspectives on intrarenal renin-angiotensin system: focus on intracrine/intracellular angiotensin II. Peptides. 2011 Jul;32(7):1551-65.

79. Reudelhuber TL. Deciphering the roles of tissue renin-angiotensin systems in whole animals. Hypertension. 2011 Mar;57(3):532-7.

80. De Mello WC, Danser AH. Angiotensin II and the heart : on the intracrine renin-angiotensin system. Hypertension. 2000 Jun;35(6):1183-8.

81. De Mello WC, Frohlich ED. On the local cardiac renin angiotensin system. Basic and clinical implications. Peptides. 2011 Aug;32(8):1774-9.

82. Ichihara S, Senbonmatsu T, Price E, Jr., Ichiki T, Gaffney FA, Inagami T. Angiotensin II type 2 receptor is essential for left ventricular hypertrophy and cardiac fibrosis in chronic angiotensin II-induced hypertension. Circulation. 2001 Jul 17;104(3):346-51.

83. Mifune M, Sasamura H, Shimizu-Hirota R, Miyazaki H, Saruta T. Angiotensin II type 2 receptors stimulate collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. Hypertension. 2000 Nov;36(5):845-50.

84. Cardinale D, Colombo A, Cipolla CM. Prevention and treatment of cardiomyopathy and heart failure in patients receiving cancer chemotherapy. Curr Treat Options Cardiovasc Med. 2008 Dec;10(6):486-95.

85. Robbins ME, Diz DI. Pathogenic role of the renin-angiotensin system in modulating radiationinduced late effects. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2006 Jan 1;64(1):6-12.

86. Corsetti G, Pasini E, Assanelli D, Bianchi R. Effects of acute caffeine administration on NOS and Bax/Bcl2 expression in the myocardium of rat. Pharmacol Res. 2008 Jan;57(1):19-25.

87. Hetz C. BCL-2 protein family. Essential regulators of cell death. Preface. Adv Exp Med Biol. 2010;687:vii-viii.

88. Kunapuli S, Rosanio S, Schwarz ER. "How do cardiomyocytes die?" apoptosis and autophagic cell death in cardiac myocytes. J Card Fail. 2006 Jun;12(5):381-91.

89. Hochhauser E, Kivity S, Offen D, Maulik N, Otani H, Barhum Y, et al. Bax ablation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in transgenic mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003 Jun;284(6):H2351-9.

90. Zhou L, Sung RY, Li K, Pong NH, Xiang P, Shen J, et al. Cardioprotective effect of dexrazoxane in a rat model of myocardial infarction: anti-apoptosis and promoting angiogenesis. Int J Cardiol. 2011 Oct 20;152(2):196-201.

91. Siltanen A, Kitabayashi K, Patila T, Ono M, Tikkanen I, Sawa Y, et al. Bcl-2 improves myoblast sheet therapy in rat chronic heart failure. Tissue Eng Part A. 2011 Jan;17(1-2):115-25.

92. Liou CM, Yang AL, Kuo CH, Tin H, Huang CY, Lee SD. Effects of 17beta-estradiol on cardiac apoptosis in ovariectomized rats. Cell Biochem Funct. 2010 Aug;28(6):521-8.

93. Ferreira-Machado SC, Salata C, Rocha NN, Correa AF, Corte-Real S, Peregrino AA, et al. Caspase-3 activation and increased procollagen type I in irradiated hearts. An Acad Bras Cienc. 2013 Mar 1:0.

94. Mercuro G, Cadeddu C, Piras A, Dessi M, Madeddu C, Deidda M, et al. Early Epirubicin-Induced Myocardial Dysfunction Revealed by Serial Tissue Doppler Echocardiography: Correlation with Inflammatory and Oxidative Stress Markers. The Oncologist. 2007;12(9):1124-33.

95. Sawaya H, Sebag IA, Plana JC, Januzzi JL, Ky B, Tan TC, et al. Assessment of Echocardiography and Biomarkers for the Extended Prediction of Cardiotoxicity in Patients Treated With

Anthracyclines, Taxanes, and Trastuzumab. Circulation: Cardiovascular Imaging. 2012;5(5):596-603.
96. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited.
FASEB J. 2008 Mar;22(3):659-61.

97. Kruse JJ, Zurcher C, Strootman EG, Bart Cl, Schlagwein N, Leer JW, et al. Structural changes in the auricles of the rat heart after local ionizing irradiation. Radiother Oncol. 2001 Mar;58(3):303-11.

98. Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A. Recommendations regarding quantitation in Mmode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. Circulation. 1978 Dec;58(6):1072-83.

99. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. Biotechniques. 2005 Jul;39(1):75-85.

100. Mattfeldt T, Mall G, Gharehbaghi H, Moller P. Estimation of surface area and length with the orientator. J Microsc. 1990 Sep;159(Pt 3):301-17.

101. Pisacane AM, Picciotto F, Risio M. CD31 and CD34 expression as immunohistochemical markers of endothelial transdifferentiation in human cutaneous melanoma. Cell Oncol. 2007;29(1):59-66.

102. Tschanz SA, Burri PH, Weibel ER. A simple tool for stereological assessment of digital images: the STEPanizer. J Microsc. 2011 Jul;243(1):47-59.

103. Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. An Acad Bras Cienc. 2003 Dec;75(4):469-86.

104. Sridharan G, Shankar AA. Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. J Oral Maxillofac Pathol. 2012 May;16(2):251-5.

105. Longobardi S, Cittadini A, Stromer H, Katz SE, Grossman JD, Clark RG, et al. Echocardiographic assessment of cardiac morphology and function in mutant dwarf rats. Growth Horm IGF Res. 2000 Oct;10(5):242-7.

106. Bai Y, Cui W, Xin Y, Miao X, Barati MT, Zhang C, et al. Prevention by sulforaphane of diabetic cardiomyopathy is associated with up-regulation of Nrf2 expression and transcription activation. J Mol Cell Cardiol. 2013 Jan 23;57C:82-95.

107. Wang J, Xu J, Wang Q, Brainard RE, Watson LJ, Jones SP, et al. Reduced cardiac fructose 2,6 bisphosphate increases hypertrophy and decreases glycolysis following aortic constriction. PLoS One. 2013;8(1):e53951.

108. Salata C, Ferreira-Machado SC, Mencalha AL, de Andrade CB, de Campos VM, Mandarim-de-Lacerda CA, et al. Chemotherapy and radiation regimens to breast cancer treatment induce changes in mRNA levels of renin-angiotensin system related genes in cardiac tissue. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 2012 Nov 6.

109. Liu H, Xiong M, Xia YF, Cui NJ, Lu RB, Deng L, et al. Studies on pentoxifylline and tocopherol combination for radiation-induced heart disease in rats. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2009 Apr 1;73(5):1552-9.

110. Lenihan DJ, Esteva FJ. Multidisciplinary Strategy for Managing Cardiovascular Risks When Treating Patients with Early Breast Cancer. Oncologist. 2008;13(12):1224-34.

111. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. Pharmacol Rev. 2004 Jun;56(2):185-229.

112. Bezerra DG, Lacerda Andrade LM, Pinto da Cruz FO, Mandarim-de-Lacerda CA. Atorvastatin attenuates cardiomyocyte loss in adult rats from protein-restricted dams. J Card Fail. 2008 Mar;14(2):151-60.

113. Abdelhalim MA. Gold nanoparticles administration induces disarray of heart muscle, hemorrhagic, chronic inflammatory cells infiltrated by small lymphocytes, cytoplasmic vacuolization and congested and dilated blood vessels. Lipids Health Dis. 2011;10:233.

114. Minor RK, Smith DL, Jr., Sossong AM, Kaushik S, Poosala S, Spangler EL, et al. Chronic ingestion of 2-deoxy-D-glucose induces cardiac vacuolization and increases mortality in rats. Toxicol Appl Pharmacol. 2010 Mar 15;243(3):332-9.

115. Wang J, Boerma M, Fu Q, Hauer-Jensen M. Significance of endothelial dysfunction in the pathogenesis of early and delayed radiation enteropathy. World J Gastroenterol. 2007 Jun 14;13(22):3047-55.

116. Baker JE, Fish BL, Su J, Haworth ST, Strande JL, Komorowski RA, et al. 10 Gy total body irradiation increases risk of coronary sclerosis, degeneration of heart structure and function in a rat model. Int J Radiat Biol. 2009 Dec;85(12):1089-100.

117. Sweeney CJ, Miller KD, Sissons SE, Nozaki S, Heilman DK, Shen J, et al. The antiangiogenic property of docetaxel is synergistic with a recombinant humanized monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor or 2-methoxyestradiol but antagonized by endothelial growth factors. Cancer Res. 2001 Apr 15;61(8):3369-72.

118. Colleoni M, Orlando L, Sanna G, Rocca A, Maisonneuve P, Peruzzotti G, et al. Metronomic low-dose oral cyclophosphamide and methotrexate plus or minus thalidomide in metastatic breast cancer: antitumor activity and biological effects. Ann Oncol. 2006 Feb;17(2):232-8.

119. Stewart JR, Fajardo LF. Radiation-induced heart disease: an update. Prog Cardiovasc Dis. 1984 Nov-Dec;27(3):173-94.

120. Adams MJ, Hardenbergh PH, Constine LS, Lipshultz SE. Radiation-associated cardiovascular disease. Critical Reviews in Oncology/Hematology. 2003;45:55-75.

121. Weber KT. Targeting pathological remodeling: concepts of cardioprotection and reparation. Circulation. 2000 Sep 19;102(12):1342-5.

122. Rosenkranz S, Flesch M, Amann K, Haeuseler C, Kilter H, Seeland U, et al. Alterations of betaadrenergic signaling and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing TGF-beta(1). Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002 Sep;283(3):H1253-62. 123. Li RK, Li G, Mickle DA, Weisel RD, Merante F, Luss H, et al. Overexpression of transforming growth factor-beta1 and insulin-like growth factor-I in patients with idiopathic hypertrophic cardiomyopathy. Circulation. 1997 Aug 5;96(3):874-81.

124. Wang Y, Liu X, Zhang D, Chen J, Liu S, Berk M. The effects of apoptosis vulnerability markers on the myocardium in depression after myocardial infarction. BMC Med. 2013 Feb 8;11(1):32.

125. Di Napoli P, Taccardi AA, Grilli A, Felaco M, Balbone A, Angelucci D, et al. Left ventricular wall stress as a direct correlate of cardiomyocyte apoptosis in patients with severe dilated cardiomyopathy. Am Heart J. 2003 Dec;146(6):1105-11.

126. Danser AH, van Kats JP, Admiraal PJ, Derkx FH, Lamers JM, Verdouw PD, et al. Cardiac renin and angiotensins. Uptake from plasma versus in situ synthesis. Hypertension. 1994 Jul;24(1):37-48.
127. Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. J Intern Med. 2008 Sep;264(3):224-36.

128. Reid AC, Silver RB, Levi R. Renin: at the heart of the mast cell. Immunol Rev. 2007 Jun;217:123-40.

129. Luscher TF. Endothelial dysfunction: the role and impact of the renin-angiotensin system. Heart. 2000 Sep;84 Suppl 1:i20-2:discussion i50.

130. Saijonmaa O, Nyman T, Stewen P, Fyhrquist F. Atorvastatin completely inhibits VEGF-induced ACE upregulation in human endothelial cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004 Jun;286(6):H2096-102.

131. Garcia-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo C, Lyden D, Rafii S, Haimovitz-Friedman A, et al. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. Science. 2003 May 16;300(5622):1155-9.

132. Darby SC, Cutter DJ, Boerma M, Constine LS, Fajardo LF, Kodama K, et al. Radiation-Related Heart Disease: Current Knowledge and Future Prospects. International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics. 2010;76(3):656-65.

133. Jelonek K, Walaszczyk A, Gabrys D, Pietrowska M, Kanthou C, Widlak P. Cardiac endothelial cells isolated from mouse heart - a novel model for radiobiology. Acta Biochim Pol. 2011;58(3):397-404.

134. Zablocki D, Sadoshima J. Knocking out angiotensin II in the heart. Curr Hypertens Rep. 2011 Apr;13(2):129-35.

135. Kumar R, Boim MA. Diversity of pathways for intracellular angiotensin II synthesis. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2009 Jan;18(1):33-9.

136. Miyazaki M, Takai S. Tissue angiotensin II generating system by angiotensin-converting enzyme and chymase. J Pharmacol Sci. 2006;100(5):391-7.

137. Lundequist A, Tchougounova E, Abrink M, Pejler G. Cooperation between mast cell carboxypeptidase A and the chymase mouse mast cell protease 4 in the formation and degradation of angiotensin II. J Biol Chem. 2004 Jul 30;279(31):32339-44.

138. Torres Tda S, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Rosiglitazone reverses cardiac adverse remodeling (fibrosis and vascularization) in perinatal low protein rat offspring. Pathol Res Pract. 2010 Sep 15;206(9):642-6.

139. Bader M, Peters J, Baltatu O, Muller DN, Luft FC, Ganten D. Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. J Mol Med (Berl). 2001 Apr;79(2-3):76-102.

140. Reid AC, Brazin JA, Morrey C, Silver RB, Levi R. Targeting cardiac mast cells: pharmacological modulation of the local renin-angiotensin system. Curr Pharm Des. 2011 Nov;17(34):3744-52.

141. Kumar R, Singh VP, Baker KM. The intracellular renin-angiotensin system in the heart. Curr Hypertens Rep. 2009 Apr;11(2):104-10.

142. Xiao HD, Fuchs S, Campbell DJ, Lewis W, Dudley SC, Jr., Kasi VS, et al. Mice with cardiacrestricted angiotensin-converting enzyme (ACE) have atrial enlargement, cardiac arrhythmia, and sudden death. Am J Pathol. 2004 Sep;165(3):1019-32. 143. Dodos F, Halbsguth T, Erdmann E, Hoppe UC. Usefulness of myocardial performance index and biochemical markers for early detection of anthracycline-induced cardiotoxicity in adults. Clin Res Cardiol. 2008 May;97(5):318-26.

144. Fukuda T, Matsumoto A, Kurano M, Takano H, Iida H, Morita T, et al. Cardiac output response to exercise in chronic cardiac failure patients. Int Heart J. 2012;53(5):293-8.

145. Cardinale D. Prognostic Value of Troponin I in Cardiac Risk Stratification of Cancer Patients Undergoing High-Dose Chemotherapy. Circulation. 2004;109(22):2749-54.

146. Liu N, Olson EN. MicroRNA Regulatory Networks in Cardiovascular Development. Developmental Cell. 2010;18(4):510-25.

147. Michael S. Ewer SMS, Daniela Cardinale, Anecita Fadol, Thomas M. Suter. Cardiac Dysfunction after Cancer Treatment. Texas Heart Institute Journal. 2011;38(3):5.

148. Prosnitz RG, Marks LB. Radiation-induced heart disease: vigilance is still required. J Clin Oncol. 2005 Oct 20;23(30):7391-4.

149. Magné N, Chargari C, MacDermed D, Conforti R, Védrine L, Spano J-P, et al. Tomorrow's targeted therapies in breast cancer patients: What is the risk for increased radiation-induced cardiac toxicity? Critical Reviews in Oncology/Hematology. 2010;76(3):186-95.