Bertha Furlan Polegato

Mecanismos envolvidos na cardiotoxicidade aguda induzida pela doxorrubicina em ratos

Tese de doutorado apresentada ao programa de pós-graduação Fisiopatologia em Clínica Médica, da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", para obtenção do título de doutor em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientador: Prof. Titular Luiz Shiguero Matsubara

Botucatu

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Polegato, Bertha Furlan.
Mecanismos envolvidos na cardiotoxicidade aguda induzida pela doxorrubicina em ratos / Bertha Furlan Polegato. – Botucatu : [s.n.], 2011

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Luiz Shiguero Matsubara
Capes: 40101002

1. Coração – Ventrículos. 2. Doxorrubicina. 3. Citocinas.

Palavras-chave: Citocinas inflamatórias; Função ventricular; Homeostase do cálcio; Langendorff; Metaloproteinases.

DEDICATÓRIA

A minha Mãe

AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento especial a meu orientador

Professor Titular Luiz Shiguero Matsubara

Que ao longo desses anos despertou meu amor pela pesquisa e que foi meu grande estimulador. É meu maior exemplo dentro do meio universitário e fico extremamente agradecida pela paciência e tranquilidade com que permitiu que eu crescesse. Agradeço pela confiança empenhada em mim desde o início e pelos preciosos ensinamentos que carregarei comigo ao longo da minha vida.

À minha família

Pedro Gilberto Polegato

Sandra Inês Furlan Polegato

Bruna Furlan Polegato

Vocês são a base de minha fortaleza e convicções.

Às amigas

Cintia Zumstein Camargo

Mariane Toyoshima

Miriam Shiroma

Vocês foram a família longe de casa e são parte do que me tornei ao longo deste caminho.

A meu namorado

Leonardo Rufino Garcia

Que me ensinou que sempre é possível recomeçar.

Aos meus mestres da Clínica Médica Geral:

Luiz Shiguero Matsubara

Sérgio Alberto Rupp de Paiva

Marina Politi Okoshi

Leonardo Antônio Mamede Zornoff

Roberto Minoru Tani Inoue

Marcos Ferreira Minicucci

Paula Schmidt Azevedo Gaiolla

Vocês são meu espelho e minha inspiração constante, pessoal e profissionalmente.

Aos professores

Beatriz Bojikian Matsubara

Pela realização de todos os ecocardiogramas e pela presença e ensinamentos constantes durante todas as etapas de realização deste trabalho.

Leonardo Antônio Mamede Zornoff

Katashi Okoshi

Pela imprescindível ajuda durante o exame de qualificação e grande contribuição na qualidade desta tese.

Ao professor

Robson Francisco Carvalho, do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu, e ao pós-graduando Eduardo Castan

Sem os quais não seria possível a realização do PCR em tempo real. Obrigada pela disponibilidade e atenção dedicada.

Aos médicos e amigos

Luis Augusto Bianchi, Leandro Caetano Vilela Lemos, Marcos Mitsuo Seki, Meliza Goi Roscani

Pelo apoio incondicional, pela amizade e por toda ajuda durante a realização deste trabalho.

Aos pós-graduandos e amigos

Aline, Bruna Rafacho, Camila Bonomo, Daniele, Marcelo, Mariana Dorna, Maria Thereza, Miriane, Paula Martinez, Priscila, Ricardo, Silvio

Obrigada pela companhia e pelos risos em todos os momentos.

À equipe do laboratório experimental

Corina, Elenize, Sueli Clara, José Georgete, Vitor

E em especial ao amigo Mario Batista Bruno

Que com muita dedicação contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Médica

Alexandre, Bruno, Elisângela, Laura, Mário, Renato

Obrigada por estarem sempre dispostos e disponíveis, especialmente ao Mário, pela ajuda na formatação desta tese.

Aos funcionários da seção de pós-graduação, da biblioteca e todos os outros não citados aqui, mas que contribuíram de alguma forma ao longo destes três anos.

Muito obrigada a todos!

SUMÁRIO

Resumo 1
Abstract 4
Introdução 7
Objetivos 14
Materiais e Métodos 16
Indução da cardiotoxicidade 17
Avaliação ecocardiográfica 18
Estudo do coração isolado 19
Estudo morfológico 21
Dosagem de citocinas inflamatórias 22
Reação em cadeia da polimerase em tempo real 23
Atividade das metaloproteinases 27
Análise estatística 28
Resultados 29
Resultados morfométricos. 30
Ecocardiograma 30
Estudo do coração isolado 34
Resultados histológicos 35
Dosagem de citocinas inflamatórias 36
Atividade das metaloproteinases 37
Reação em cadeia da polimerase em tempo real 39
Discussão 41
Conclusões 52
Referências bibliográficas 54
Anexos 61

RESUMO

A doxorrubicina, ou adriamicina, é uma droga utilizada como agente antineoplásico no tratamento de tumores sólidos e neoplasias hematológicas, principalmente. Apesar de seu amplo uso, apresenta como efeito colateral mais importante a cardiotoxicidade. A toxicidade crônica é bastante conhecida e estudada e cursa com miocardiopatia dilatada e quadro clínico clássico de insuficiência cardíaca. A toxicidade aguda, por cursar com quadro clínico pouco exuberante e manifestar-se através de alterações eletrocardiográficas, é muito pouco diagnosticada e seu mecanismo fisiopatológico não é totalmente conhecido. Os mecanismos envolvidos na toxicidade cardíaca são distintos dos mecanismos de ação da droga e são múltiplos: aumento do estresse oxidativo, aumento da apoptose e alteração na dinâmica intracelular do cálcio. Nossa hipótese é que ocorra lesão estrutural e funcional cardíaca, precocemente, após infusão da doxorrubicina. O objetivo do presente estudo foi avaliar a função ventricular esquerda agudamente após administração de doxorrubicina, a expressão gênica das proteínas reguladoras do trânsito de cálcio, a atividade de metaloproteinases 2 e 9 no miocárdio e alterações das citocinas inflamatórias no miocárdio de ratos tratados com a droga. Para isso, foram utilizados ratos Wistar machos adultos (n=35), que foram submetidos à infusão intraperitoneal de dose única de doxorrubicina de 20 mg/Kg ou volume equivalente de salina (grupo controle). Os animais foram eutanasiados 48 horas após injeção da droga. Todos os ratos foram submetidos ao ecocardiograma antes e 48 horas após a injeção da doxorrubicina. Além da avaliação da função cardíaca *in vivo* pelo ecocardiograma, a função ventricular esquerda foi avaliada *in vitro* através de estudo do coração isolado, segundo preparação de Langendorff. Foi realizada microscopia óptica com coloração hematoxilina-eosina para análise morfológica e infiltrado inflamatório e Picrosirius red para análise do colágeno intersticial. Além disso, o tecido cardíaco foi submetido à zimografia para avaliação

de atividade de metaloproteinases 2 e 9, dosagem de citocinas inflamatórias (TNF- , IFN- , IL-1 e ICAM-1) através do método ELISA e expressão gênica de RNA mensageiro para as proteínas reguladoras do trânsito de cálcio (receptor rianodínico, fosfolamban e Serca-2a) através da técnica de PCR em tempo real. Houve diminuição do peso corporal dos ratos tratados 48 horas após infusão da droga, provavelmente devido à desidratação. Foi observada disfunção diastólica (aumento do tempo de relaxamento isovolumétrico) e sistólica do ventrículo esquerdo (diminuição da fração de encurtamento, do débito cardíaco e da fração de ejeção) ao ecocardiograma. *In vitro*, houve aumento da rigidez passiva miocárdica no grupo que recebeu a doxorrubicina. Essa alteração da função cardíaca não foi acompanhada de alteração nas citocinas inflamatórias ou na expressão de Serca-2a, fosfolamban e receptor rianodínico. Também não houve diferença entre os grupos na análise da microscopia óptica. No entanto, houve ativação de metaloproteinases 2 e 9 no miocárdio dos ratos tratados quando comparados com o grupo controle. Em conclusão, a doxorrubicina é capaz de provocar disfunção diastólica e sistólica em ratos, precocemente, e esta disfunção está associada a aumento de atividade de metaloproteinases 2 e 9. Não houve diferença na expressão das proteínas reguladoras do trânsito de cálcio ou na concentração de citocinas inflamatórias entre os grupos estudados.

ABSTRACT

Doxorubicin, or adriamycin, is a drug used as an antineoplastic agent in the treatment of solid tumors and hematologic malignancies. Despite of its use, there are several side effects, and the most important is cardiotoxicity. Chronic toxicity is well known and studied. It presented with dilated cardiomyopathy and clinical features of heart failure. The acute toxicity has mild clinical signs manifesting usually as electrocardiographic changes. Probably, this acute effect is underdiagnosed and the pathophysiological mechanism is not fully understood.

The mechanisms involved in cardiac toxicity are multiple, and include increased oxidative stress, increased apoptosis and alteration in intracellular calcium dynamics. Our hypothesis is that structural and functional damage occurs in the heart early after infusion of doxorubicin. The purpose of this study was to evaluate left ventricular function acutely after doxorubicin administration. In addition, gene expression of calcium regulatory proteins, activity of metalloproteinases 2 and 9, and inflammatory cytokines in the myocardium of rats treated with this drug will also be evaluated. Thus, we used adult male Wistar rats (n = 35) who received a single-dose, by intraperitoneal infusion, of doxorubicin (20 mg / kg) or equivalent volume of saline (control group). After 48 hours of drug injection the rats were euthanized. All animals were submitted to echocardiography before drug infusion and immediately before euthanasia. Besides *in vivo* cardiac function evaluation by echocardiography. *In vitro* left ventricular function was assessed by isolated perfusion heart study, according to Langendorff preparation. We evaluated interstitial collagen and myocyte hypertrophy by light microscopy, and cardiac tissue metalloproteinases 2 and 9 activity was assessed by zymography. In addition, cardiac tissue concentrations of inflammatory cytokines (TNF-, IFN-, IL-1 and ICAM-1) were analyzed by ELISA, and gene expression of calcium regulatory proteins (ryanodine receptor, and fosfolamban Serca-2a) by real-time PCR. There was a reduction in rat's body weight after 48

hours of drug infusion, probably due to dehydration. Echocardiographic analysis showed left diastolic (increased isovolumetric relaxation time) and systolic dysfunction (decreased fractional shortening, cardiac output and ejection fraction). In Isolated perfusion heart study, there was increased myocardial passive stiffness in the treated group. These alterations of cardiac function were not accompanied by changes in inflammatory cytokines or expression of Serca-2a, fosfolamban or ryanodine receptor. However, there were early activation of metalloproteinases 2 and 9 in the myocardium of the rats treated with doxorubicin when compared with the control group. In conclusion, doxorubicin caused early systolic and diastolic dysfunction, and this dysfunction in rats is associated with increased metalloproteinases 2 and 9 activity. There was no difference in of calcium regulatory proteins expression or inflammatory cytokines concentrations between groups.

INTRODUÇÃO

A doxorrubicina, ou adriamicina, é um antibiótico descoberto nos anos 50, derivado de pigmento vermelho produzido pelo fungo *Streptomyces peucetius*. Seu uso, como agente antineoplásico, iniciou-se nos anos 60, para tratamento de diversos tipos de neoplasias, destacando-se os tumores sólidos e as neoplasias hematológicas (1). É utilizada em mais de 50% dos esquemas de tratamento de neoplasias na infância e está relacionada a taxas de sobrevida maiores que 75% nesta população (2).

A estrutura da doxorrubicina consiste em anel tetracíclico com dois grupamentos adjacentes, o grupo quinona/hidroquinona e o grupo aminoaçúcar denominado daunosamina. Além da doxorrubicina, outras drogas dessa classe são amplamente utilizadas na prática clínica como a daunorrubicina, a epirrubicina e a idarrubicina (3), sendo as duas últimas derivadas semissintéticas da doxorrubicina e da daunorrubicina, respectivamente (4). As estruturas dessas drogas apresentam pequenas diferenças em relação à doxorrubicina, que implicam em mudanças no espectro de ação: doxorrubicina é utilizada no tratamento do câncer de mama, tumores sólidos da infância, sarcomas e linfomas; já a daunorrubicina apresenta maior benefício nas leucemias linfóide e mielóide agudas (3).

A atividade antineoplásica da doxorrubicina deve-se, principalmente, à sua ação junto ao DNA. Embora os mecanismos exatos de ação não estejam completamente elucidados, sabe-se que essa droga inibe a DNA topoisomerase II, bloqueia a DNA polimerase, insere-se entre os pares de base do DNA, impedindo a síntese de macromoléculas, induz apoptose e gera radicais livres durante sua metabolização (5).

Apesar de sua alta efetividade no tratamento do câncer, a doxorrubicina apresenta efeitos colaterais graves, sendo a cardiotoxicidade o mais importante e, muitas vezes, limitante no tratamento (6). O potencial da doxorrubicina de induzir

insuficiência cardíaca já é conhecido desde final dos anos 60, sendo que este efeito adverso é dependente da dose cumulativa da droga e da maneira de infusão (2). A cardiotoxicidade é dividida em 4 formas clínicas: aguda, subaguda, crônica e tardia e esta divisão está relacionada ao tempo decorrido entre o término da quimioterapia e o início dos sintomas. A toxicidade crônica é a mais conhecida e estudada e ocorre em 0,4 a 23% dos pacientes tratados. Manifesta-se como miocardiopatia dilatada e quadro clínico típico de insuficiência cardíaca. Surge semanas a meses após a quimioterapia, observando-se aumento progressivo da incidência conforme se eleva a dose total utilizada, sendo o valor crítico 500 a 550 mg/m^2 (6). Doses menores que 550 mg/m^2 cursam com insuficiência cardíaca em 0,1 a 0,2% dos pacientes tratados, sendo que a incidência sobe para 50% quando a dose total utilizada é de 1000 mg/m^2 (6). No entanto, há ainda a possibilidade de aparecimento de quadro clínico de insuficiência cardíaca com miocardiopatia dilatada ou arritmias, anos após o tratamento, mesmo com baixas doses da droga (< 500 mg/m^2). Esse efeito é conhecido como toxicidade tardia e sua incidência é em torno de 5% (7). A toxicidade subaguda é rara e ocorre de dias a semanas após o término da quimioterapia e costuma manifestar-se como pericardite e/ou miocardite (7).

A doxorrubicina pode induzir efeitos colaterais agudos, imediatamente após a infusão da droga ou em 2 a 3 dias. Mais comumente ocorrem náuseas, vômitos, inapetência, alopécia e neutropenia, mas pode haver aparecimento de toxicidade cardíaca neste período, com incidência de aproximadamente 11% (8). Na maioria dos casos, o paciente encontra-se assintomático e as manifestações clínicas mais frequentemente observadas são as alterações eletrocardiográficas: alteração inespecífica da repolarização ventricular, complexos QRS de baixa voltagem, taquicardia sinusal, extrassístoles ventriculares e supraventriculares e alongamento do segmento QT. Em menos de 1% dos casos pode ocorrer morte súbita,

provavelmente associada à presença de arritmias (6). O potencial da doxorrubicina cursar com arritmias está relacionado tanto com o efeito direto da droga sob o miocárdio quanto com o efeito indireto: a doxorrubicina estimula a liberação de catecolaminas e histamina, que facilitam a entrada de cálcio na célula cardíaca e também pode levar a distúrbios no transporte de membrana de sódio e potássio (5). O risco de ocorrerem arritmias é maior quando a infusão da droga é realizada em administração única de alta dose (6). Há escassez de estudos na literatura sobre a cardiotoxicidade aguda induzida pela doxorubicina, mas há evidências de que ocorra dano miocárdico agudo, a despeito de quadro clínico pouco exuberante ou ausente.

Os mecanismos envolvidos na gênese da cardiotoxicidade doxo-induzida são parcialmente distintos dos mecanismos relacionados a seu efeito antitumoral e ainda não estão completamente elucidados (4). Um dos mecanismos mais importantes no desenvolvimento da lesão cardíaca é o aumento do estresse oxidativo. A geração de espécies reativas de oxigênio mediada pela doxorrubicina ocorre por 2 vias: 1) enzimática, via citocromo p450. Há redução da doxorrubicina pela NADPH redutase e formação de radical semiquinona, que em contato com O_2 e H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) gera os radicais livres superóxido e hidroxil. 2) via não-enzimática, durante as reações da doxorrubicina que envolvem o ferro (5). Ocorre também aumento da peroxidação lipídica, que tem papel fundamental na lesão da membrana celular, vacuolização mitocondrial e perda de miofibrilas induzida pela doxorrubicina (5). O miocárdio é mais susceptível à lesão oxidativa porque apresenta baixos níveis de catalase e superóxido dismutase, além da doxorrubicina ser capaz de inativar a glutationa-peroxidase no tecido cardíaco (4).

O aumento do estresse oxidativo, por si só, é capaz de produzir lesão do miócito, mas a formação de radicais livres também induz apoptose através ativação da p38 proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e inibição da serina/treonina

quinase (Atk), proteína citosólica que fornece sinal antiapoptótico (4). A apoptose também pode estar ativada por outras vias, além do estímulo oxidativo, como a via citocromo C. O citocromo C é uma proteína localizada na mitocôndria, que é liberada no interior da célula onde interage com procaspase-9, culminando com ativação da caspase-3, conhecidamente indutora de apoptose. A regulação da apoptose também depende da concentração de proteínas, como Bax e Bcl-2. A formação de dímeros Bax-Bax cria poros na membrana mitocondrial e facilita a liberação de citocromo C, estimulando, por sua vez, a apoptose; a formação de dímeros Bcl-2-Bax previne a formação destes poros, inibindo apoptose (9). Após a administração de doxorrubicina ocorre aumento da relação Bax/Bcl-2, constituindo importante estímulo apoptótico (10). A infusão de doxorrubicina inibe a expressão de GATA-4 em estudo realizado com miócitos isolados e a expressão ectópica de GATA-4 atenua a apoptose (11). O GATA-4 é um fator de transcrição que regula a expressão de genes específicos no miocárdio, constituindo estímulo antiapoptótico (10).

Parece não haver dúvidas na literatura a respeito do papel fundamental do aumento do estresse oxidativo e do aumento da apoptose na gênese da lesão cardíaca pela doxorrubicina, mas ainda não se sabe exatamente qual é a participação da inflamação, das metaloproteinases ou do cálcio no desenvolvimento da lesão cardíaca após a ativação inflamatória e a formação de radicais livres.

Os mediadores inflamatórios, principalmente interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral-α (TNF-α), também participam na formação de espécies reativas de oxigênio e na indução de apoptose e, por esta razão, poderiam estar envolvidos na gênese da lesão cardíaca induzida pela doxorrubicina. O papel da inflamação em diversos modelos de agressão cardíaca já é bem conhecido, mas os resultados obtidos no modelo de cardiotoxicidade pela doxorrubicina ainda são controversos. A doxorrubicina, em camundongos, aumentou os níveis circulantes de IL-1 e a

administração de antagonista do receptor da IL-1 foi capaz de diminuir a taxa de apoptose (12). Além disso, em cardiomiócitos isolados o uso de TNF-α (fator de necrose tumoral α) exógeno, associado ao uso de adriamicina, aumentou a taxa de apoptose (13). Por outro lado, estudo do papel agudo da inflamação na instalação da cardiotoxicidade pela doxorrubicina não mostrou alteração na expressão ou na concentração dos níveis séricos das citocinas inflamatórias (14). Além disso, esses mediadores, principalmente o TNF-α, tem a capacidade de ativar metaloproteinases da matriz extracelular em diversos modelos de agressão miocárdica (15).

As metaloproteinases são enzimas proteolíticas zinco-dependentes, encontradas no interstício e produzidas por diversos tipos de células, principalmente fibroblastos, macrófagos, mastócitos, cardiomiócitos e células endoteliais (16). A ativação das metaloproteinases, que pode ocorrer por aumento da inflamação ou do estresse oxidativo, leva à quebra do colágeno intersticial e, consequentemente, o deslizamento dos cardiomiócitos o que favorece a dilatação ventricular (17). Possivelmente, as metaloproteinases estão envolvidas na gênese da cardiotoxicidade pela doxorrubicina já que esta, na sua forma clínica mais comum, cursa com miocardiopatia dilatada. De fato, estudo realizado com autopsia de pacientes com leucemia aguda que evoluíram para óbito, que estavam em uso de doxorrubicina, evidenciou presença de dilatação ventricular em 50% dos pacientes estudados (18). O papel das metaloproteinases no processo de remodelamento já está bem estabelecido em diversos modelos experimentais: infarto agudo do miocárdio e nos modelos de sobrecarga pressórica e volumétrica (17). Em camundongos, houve aumento da expressão gênica de metaloproteinase 2 e 9 no miocárdio a partir do segundo dia após tratamento com doxorrubicina (19). Portanto, a atuação das metaloproteinases cardíacas, principalmente as formas 2 e 9 (20),

podem ter papel no desenvolvimento de cardiotoxicidade aguda induzida por essa droga.

Além das alterações inflamatórias, do efeito apoptótico e da ativação das metaloproteinases, a doxorrubicina parece interferir com a homeostase do cálcio. O íon cálcio é elemento importante no processo de contração e relaxamento muscular, interagindo com a troponina C e participando na despolarização/repolarização do miócito. Apesar de essencial para o funcionamento cardíaco, o aumento do cálcio no citosol é um dos gatilhos para ocorrência de dano celular e indução de apoptose por ativação direta da caspase (21). Bem como nas outras formas de insuficiência cardíaca, ocorre na cardiotoxicidade crônica induzida pela doxorrubicina diminuição a expressão gênica das proteínas envolvidas na homeostase de cálcio: receptor rianodínico, Serca-2a, fosfolamban e calsequestrina após infusão da droga em coelhos (22). Apesar da alteração no trânsito de cálcio intracelular ser potencial desencadeante das alterações observadas na fase aguda da lesão cardíaca, não há dados concretos sobre o comportamento destas proteínas na cardiotoxicidade aguda induzida pela doxorubicina.

Assim, acreditamos que haja lesão cardíaca estrutural e funcional, precocemente, nos ratos submetidos à infusão aguda de doxorrubicina, mesmo na ausência de quadro clínico exuberante e que essas alterações podem ser decorrentes de alterações na homeostase do cálcio e da degradação do colágeno intersticial, estimulada pela resposta inflamatória.

OBJETIVOS

Avaliar os efeitos cardíacos agudos da infusão da doxorrubicina por meio de variáveis morfológicas, funcionais, citocinas inflamatórias, atividade de metaloproteinases 2 e 9 e proteínas reguladoras do trânsito de cálcio.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados ratos Wistar machos, com 25 a 30 semanas de idade, provenientes do Biotério Central do Campus de Botucatu. Foram utilizados 25 animais para estudo funcional com coração isolado e estudo morfológico e 10 animais para a dosagem de citocinas inflamatórias, determinação dos RNAm das proteínas reguladoras do trânsito do cálcio e de atividade das metaloproteinases. Este cuidado foi necessário para afastar a influência da perfusão retrógrada, realizada durante estudo do coração isolado, sobre a atividade colagenolítica, produção de citocinas inflamatórias e quantidade de RNA no tecido cardíaco. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal da FMB – UNESP, Protocolo 666/08 (anexo 1).

Cálculo do tamanho amostral

A função sistólica foi mensurada pela velocidade máxima de elevação da pressão sistólica na unidade de tempo (+dP/dt), em modelo de coração isolado. Para detecção de 10% de variação e considerando-se o valor normal de 3800 ± 244 mmHg/s (valores médios de estudos prévios realizados no nosso laboratório) e 2 grupos experimentais, com poder do teste de 0,80, houve necessidade de 11 animais para cada grupo experimental.

Indução da cardiotoxicidade pela doxorubicina

A cardiotoxicidade aguda foi induzida por meio de injeção intraperitoneal de 20 mg/kg de doxorubicina em dose única (9, 23-25). Os animais foram estudados 48 horas após a injeção da droga e constituíram o grupo Doxo. O grupo controle foi constituído por ratos de mesmo sexo, peso e idade, que receberam injeção intraperitoneal de salina, na mesma proporção de volume do grupo Doxo.

Os animais foram submetidos à eutanásia 48 horas após o tratamento, com injeção intraperitoneal de tiopental sódico (50 mg/kg), de acordo com as diretrizes estabelecidas pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal e em conformidade com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Avaliação Ecocardiográfica

Todos os animais foram submetidos a estudo ecocardiográfico imediatamente antes da injeção intraperitoneal da doxorrubicina, para avaliar a homogeneidade entre os grupos estudados, e 48 horas após a injeção da doxorrubicina. Para isso, receberam anestesia leve com ketamina (50 mg/kg) e xilazina (1 mg/kg) e foram posicionados em decúbito lateral esquerdo parcial. Foi utilizado o equipamento HDI 5000, marca Philips, dotado de transdutor multifrequencial de 7-12 MHz. Todas as variáveis foram obtidas a partir dos cortes paraesternal eixo longo e curto e apical quatro e cinco câmaras. Os exames foram realizados pelo mesmo examinador, que era cego em relação ao tratamento.

As variáveis morfológicas analisadas ao Doppler-ecocardiograma foram: diâmetro do átrio esquerdo, espessura da parede posterior, diâmetros diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo e diâmetro da via de saída do ventrículo esquerdo. Para avaliação da função diastólica foram mensuradas, através do Doppler transmitral, as ondas A e E e o tempo de relaxamento isovolumétrico do ventrículo esquerdo. Para avaliação da função sistólica foram calculados o volume sistólico (a partir do fluxo sistólico na via de saída do ventrículo esquerdo), a fração de ejeção, a fração de encurtamento do ventrículo esquerdo, obtida pelo diâmetro diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo, e o débito cardíaco (através do volume sistólico e da frequência cardíaca). A frequência cardíaca foi calculada a partir da distância

entre dois ciclos cardíacos consecutivos e todos os valores foram obtidos a partir da média de 3 batimentos consecutivos.

Estudo da função ventricular em coração isolado: preparação de Langendorff

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg, intraperitoneal) e submetidos à injeção intraperitoneal de 2000 UI de heparina não fracionada. Imediatamente, foi realizada a esternotomia mediana, com ventilação assistida, e dissecada a aorta ascendente. A aorta foi canulada e iniciada a perfusão retrógrada com solução de Krebs-Henseleit (composição, em milimoles/litro: 118,5 NaCl; 4,69 KCl; 2,52 $CaCl_2$; 1,16 $MgSO_4$; 1,18 KH_2PO_4; 5,50 glicose ; 25,88 $NaHCO_3$ e manitol). Antes de sua utilização essa solução foi filtrada com filtro de acetato de celulose com poro de 5 µm. Durante a perfusão do coração, a temperatura da solução e a pressão de perfusão foram mantidas constantes, 37°C e 75 mmHg, respectivamente. A pressão parcial de oxigênio (PO_2) da solução foi mantida entre 550 e 600 mmHg por meio de contato da película de solução de Krebs com gás carbogênio (95% O_2, 5% CO_2). O coração, conectado à cânula perfusora, foi rapidamente retirado e transferido para o aparato de perfusão de coração isolado tamanho 3, tipo 830 da Hugo Sachs Elektronik - March-Hugstetten, Germany (figura 1). A auriculeta esquerda foi retirada para a introdução de balão de látex (volume aproximado de 40 microlitros) na cavidade ventricular esquerda. O volume do balão era conhecido em cada momento e este era conectado a transdutor de pressão P23XL, que permitiu a aferição precisa da pressão ventricular durante todo o experimento. O estudo funcional apresentou os seguintes passos:

1) Determinação do volume para obtenção de pressão ventricular diastólica de zero mmHg (V0).

2) À partir do V0 foram acrescidos, sucessivamente, 10 ou 20 microlitros de água ao volume do balão até obter-se pressão diastólica de 30 mmHg. A cada acréscimo, foram registradas as curvas de pressão do VE e da primeira derivada temporal da pressão (+dP/dt e –dP/dt), utilizando-se polígrafo da GOULD, modelo Windowgraf (figura 2).

3) A calibração dos traçados permitiu a aferição das pressões sistólicas e diastólicas do ventrículo esquerdo correspondentes aos diferentes volumes. À obtenção dos dados de pressão e volume, foram construídas curvas de relação pressão-volume sistólica e diastólica.

As relações estresse-deformação sistólicos e diastólicos foram calculadas utilizando-se as seguintes formulas:

$$\text{Estresse} = (1{,}36 \times PVE \times VVE^{2/3}) / [(VVE + 0{,}943 \times MVE)^{2/3} - VVE^{2/3}]$$

$$\text{Deformação} = \{[VVE^{1/3} + (VVE + 0{,}943 \times MVE)^{1/3}] / [V0^{1/3} + (V0 + 0{,}943 \times MVE)^{1/3}] - 1\} \times 100,$$

onde PVE é pressão do ventrículo esquerdo; VVE é o volume do ventrículo esquerdo; MVE é a massa do ventrículo esquerdo. Estresse é expresso em g/cm^2 e deformação miocárdica em porcentagem (%).

A complacência ventricular foi mensurada a partir da curva de relação pressão-volume diastólicos, sendo determinada como a variação de volume necessária para elevar a pressão diastólica de zero a 20 mmHg ($\Delta V20$). A rigidez passiva miocárdica foi determinada a partir da curva de relação estresse-deformação diastólicos e foi determinado como deformação necessária para provocar estresse de 20 g/cm^2 (26).

Terminado o experimento, o coração foi retirado do aparato de perfusão e os ventrículos direito e esquerdo foram separados e pesados.

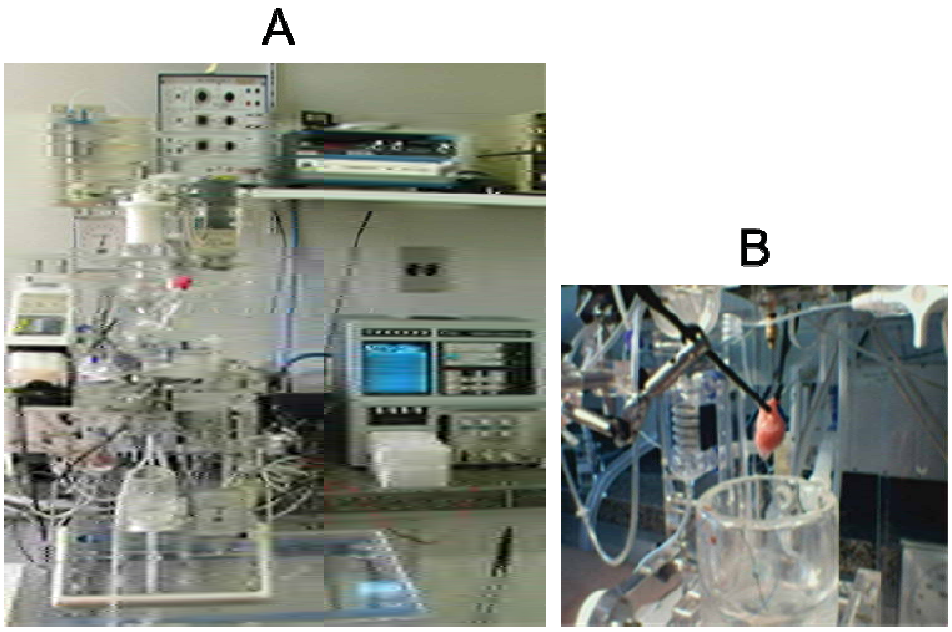

Figura 1: Aparato do coração isolado

A: visão geral da aparelhagem para realização do estudo do coração isolado. B: coração do rato colocado no aparato, já sendo perfundido, com o balão intraventricular alocado e com marcapasso (haste preta) posicionado próximo aos átrios.

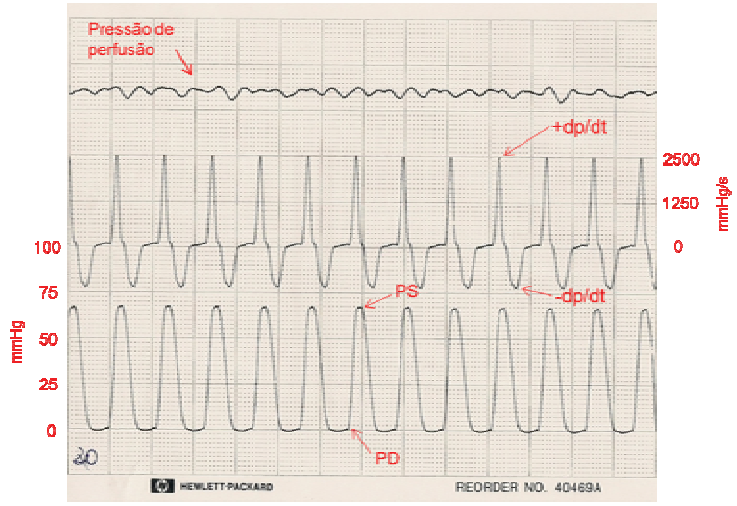

Figura 2: Registro gráfico das medidas de pressão diastólica e sistólica e das derivadas positiva e negativa.

O traçado superior representa a pressão de perfusão coronariana, o traçado intermediário representa as derivadas positiva e negativa e o traçado inferior mostra a curva de pressão ventricular para determinado volume (marcação realizada no canto inferior esquerdo da figura).

Estudo Morfológico

Após a eutanásia, amostras de tecido cardíaco, obtidas de corte seccional do ventrículo esquerdo 5 mm a partir do ápice, foram fixadas em solução tamponada de formol a 10% por período de 48 horas. Após a fixação, o tecido foi incluso em blocos

de parafina, obtendo-se a seguir, cortes histológicos coronais de 4 µm para coloração com Hematoxilina-Eosina (HE). Cortes histológicos de 6 µm foram corados pelo Picrosirius red, coloração específica para colágeno. Os cortes histológicos corados pelo HE foram utilizados para análise histológica para identificação de infiltrado inflamatório, alterações vasculares, intersticiais ou miocárdicas. As lâminas coradas pelo Picrosirius red foram utilizadas para a quantificação da fração de colágeno intersticial por meio de vídeo-densitometria. Imagens do tecido cardíaco foram capturadas por computador IBM compatível e analisadas por software de análise de imagens Image Pro-plus (Media Cybernetics, Sever Spring, Maryland, USA). Os elementos do tecido cardíaco foram identificados de acordo com os níveis de cor. Assim, as fibras colágenas apareceram vermelhas, os miócitos, amarelos e os espaços, brancos. O perfil digitalizado foi analisado pelo computador que calculou o volume de fração do colágeno bem como a soma de toda área do tecido conectivo dividido pela soma da área de tecido conectivo mais a área do miócito. Em média, foram analisados 30 campos com a utilização de objetiva 40X. O colágeno perivascular foi excluído da presente análise (27).

ELISA para determinação de citocinas e molécula de adesão

Para extração da proteína do tecido cardíaco foi adicionado 1,5 ml de tampão de extração (50 mM de tampão fosfato de potássio pH=7,0; 0,3 M sucrose; 0,5 mM de DTT; 1 mM de EDTA pH=8,0; PMSF 0,3 mM; NaF 10 mM; e inibidor de protease 1:100) à 60 mg de tecido cardíaco proveniente do septo interventricular. O material foi homogeneizado por 10 segundos, 2 vezes. O material extraído foi centrifugado por 20 min à 4ºC com 12.000 rpm, e o sobrenadante coletado. A quantidade de proteína do extrato foi determinada pelo método de Bradford e a concentração final ajustada para 1 mg/ml. Nesse extrato protéico foi avaliada a produção de IFN-γ,

TNF-α, IL-10 e ICAM-1. Placas de 96 poços (Nunc) foram recobertas com solução contendo anticorpo purificado de captura anti-IFN-γ ou anti-TNF-α ou anti-IL-10 ou ICAM-1 de rato (R&D Systems), diluídos em tampão PBS. As placas foram incubadas à temperatura ambiente durante uma noite. Após sucessivas lavagens com solução PBS – Tween 20 (0,05%) foi adicionado 300 µl da solução de bloqueio, constituída de PBS contendo 1% de albumina, com incubação por 2 horas, à temperatura ambiente. As placas novamente lavadas foram incubadas por 2 horas, à temperatura ambiente, com as amostras e com as respectivas curvas de citocinas, diluídas na base 2 em tampão PBS contendo 1% de albumina. Decorrido o tempo de incubação, as placas foram lavadas e incubadas com os anticorpos anti-IFN-γ ou anti-TNF-α ou anti-IL-10 ou ICAM-1 de rato biotinilados, durante 2 horas, à temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram novamente incubadas com estreptoavidina diluída 1:200 em tampão PBS contendo 1% de albumina, durante 20 minutos, à temperatura ambiente. As placas foram lavadas e reveladas com OPD (Sigma). A reação foi interrompida por adição de H_2SO_4 16% e a leitura realizada em 492 nm.

Avaliação da expressão gênica do fosfolamban, receptor rianodínico e retículo sarcoplasmático cálcio-ATPase (Serca-2a) por reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa em tempo real (RT-PCR)

Extração do ácido ribonucléico (RNA)

Fragmentos do tecido cardíaco do ventrículo esquerdo de 5 animais de cada grupo foram coletados, após eutanásia dos animais, com auxílio de material autoclavado, e rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C. As amostras congeladas foram homogeneizadas em aparelho Polytron (Ika Ultra Turrax® T25 Basic, Wilmington, NC, USA) após adição de 1 ml de

TRIzol® (Invitrogen Brasil, São Paulo) para cada 100 mg de tecido. O TRIzol®, solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato, tem como finalidade manter a integridade do RNA durante a lise celular que ocorre no processo de homogeneização.

A amostra homogeneizada foi transferida para um tubo esterilizado de 1,5 ml e incubada à temperatura ambiente durante 5 minutos, para permitir a completa dissociação do complexo núcleo-proteico. Em seguida, adicionou-se clorofórmio (Merck KGaA, Damstadt, Germany) na proporção de 0,2 ml/1ml TRIzol®; a amostra foi agitada, manualmente, com vigor por 15 segundos e incubada por 3 minutos à temperatura ambiente. Após essa segunda incubação, o material foi centrifugado (Eppendorf Centrifuge 5804R, Hamburg, Germany) a 12.000 x g durante 15 minutos a 4°C. Este processo separou a amostra em uma fase aquosa (onde se encontra o RNA) e uma fase orgânica (onde se encontra DNA e proteínas).

A porção aquosa composta de RNA foi transferida para um tubo esterilizado de 1,5 ml; a seguir, adicionou-se álcool isopropílico (Merck KGaA, Damstadt, Germany) na proporção de 0,5 ml/1ml de TRIzol®; a amostra foi, então, agitada manualmente 10 vezes por inversão, incubada por 10 minutos à temperatura ambiente e, posteriormente, centrifugada a 12.000 x g durante 10 minutos a 4ºC. Após desprezar o sobrenadante, o precipitado de RNA é visualizado como um gel esbranquiçado e semitransparente aderido no fundo do tubo (*pellet*). Este foi lavado com álcool etílico 75% (Merck KGaA, Damstadt, Germany) na proporção de 1ml/1ml de TRIzol® e centrifugado a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C. Após o álcool etílico ser descartado, o *pellet* foi seco por 10 minutos à temperatura ambiente. O sedimento de RNA foi diluído em 20 µl de água ultrapura e incubado por 10 minutos a 60°C em banho-maria (Fanem 100, São Paulo, Brasil); este procedimento teve como finalidade inativar a possível presença de RNase.

A quantificação do RNA foi realizada com auxílio de espectrofotômetro (NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer Thermo Scientific – Nanodrop Technologies). Foram analisados os valores de absorbância para comprimentos de onda de 230, 260 e 280 nm e realizadas razões entre as absorbâncias 260/230 e 260/280. As amostras cujas razões foram inferiores a 1,8 foram descartadas por apresentarem contaminação por proteínas. A concentração do RNA foi quantificada de acordo com a relação:

[RNA] = A_{260} x 40 x 70, onde:
[RNA] = concentração de RNA (µg/ml)
A_{260} = Absorbância em densidade óptica em 260 nm
40 = fator de conversão (1 unidade de densidade óptica ≈ 40 µg/ml RNA)
70 = fator de diluição

Para verificar a integridade do RNA, amostras de 1 µl do RNA total foram diluídas em 8 µl de água ultrapura e 1 µl de corante (Orange G, Acros Organics, New Jersey, USA), aplicadas em gel de agarose 1% (0,3 g agarose, 30 ml de TAE Buffer 1x, 3 µl de brometo de etídio) e submetidas a uma voltagem de 80 mV (Power Pac Basic™ Bio-Rad, Hercules, CA, USA) por 20 minutos. A integridade do RNA foi constatada pela visualização das bandas de RNA ribossômico, 28S e 18S, e ausência de rastros do RNA no gel. As amostras que se mostraram íntegras foram utilizadas como substrato para a transcrição reversa.

Transcrição reversa do RNA

Transcrição reversa é um processo que converte as moléculas do RNA em ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA). As amostras do RNA do tecido cardíaco foram submetidas à transcrição reversa pela ação da enzima *transcriptase reversa*, utilizando-se o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, CA, USA). Foi adicionado a cada microlitro de amostra 10X RT Buffer,

25X dNTP Mix, 10X RT Random Primers, MultiScribe™ Reverse Transcriptase e água nuclease-free em quantidades recomendadas pelo fabricante.

As amostras foram colocadas em termociclador (Mastercycler® Gradient, Eppendorf, Hamburg, Germany) com ciclagem programada de 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C, 5 minutos a 85°C e a partir de então mantidas a 4°C até retirada do material do termociclador. Após, foi adicionado 180 µl de água ultrapura a cada amostra para completar um volume total de 200 µl em cada tubo. O produto da transcrição reversa (cDNA) foi armazenado em freezer na temperatura de -20°C.

Para checar a qualidade da transcrição reversa, foram empregados dois controles: 1) Utilização de uma amostra qualquer a qual foi adicionado todos os componentes do kit, exceto a Transcriptase Reversa e 2) Substituição da amostra por volume igual de água ultrapura, ou seja, todos os componentes do kit sem produtos da extração de RNA.

PCR em tempo real

O PCR em tempo real foi realizado com ensaios prontos contendo sonda TaqMan MGB-FAM (TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems, CA, USA) e *primers* específicos (TaqMan Gene Expression Assay GEx, Applied Biosystems, CA, USA). A identificação dos ensaios utilizados para PCR em tempo real encontra-se descrita no quadro abaixo:

Gene	Ensaios
Atp2a2 (Serca)	Rn00568762_m1
Pln (fosfolamban)	Rn01434045_m1
Ryr2 (receptor rianodínico)	Rn01470303_m1
Ppia (ciclofilina)	Rn00690933_m1

O sistema TaqMan utiliza uma sonda fluorescente que permite a detecção de um produto específico da PCR conforme seu acúmulo durante os ciclos da reação. A sonda é constituída por um corante *reporter* fluorescente na extremidade 5´ e um

corante *quencher* (silenciador) na extremidade 3´. Enquanto a sonda está intacta, a proximidade do *quencher* reduz bastante a fluorescência emitida pelo corante *reporter* através da transferência de energia por ressonância de fluorescência. A sonda se anela à sequência antes dos *primers* e é clivada por meio da atividade da nuclease 5´da Taq DNA polimerase enquanto o *primer* é estendido. A clivagem da sonda separa o corante *reporter* do corante *quencher*, aumentando o sinal da fluorescência emitida pelo corante *reporter*. A fluorescência foi monitorada em tempo real com o aparelho StepOne Plus (Applied Biosystems, CA, USA). As amostras foram normalizadas pelo controle interno *Ciclofilina* e a quantificação da expressão realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (28). Todas as amostras foram amplificadas em triplicatas.

Determinação da atividade da metaloproteinase cardíaca: zimografia

Aproximadamente 30 mg de tecido congelado foram utilizados para extração de proteína em tampão de extração contendo: 50 mM Tris, pH 7,4; 0,2 M NaCl; 0,1% Triton X and 10 mM $CaCl_2$. Para cada 30 mg de tecido foram adicionados 1,5 ml deste tampão. As amostras foram trituradas utilizando o aparelho Ultra Turrax, 21.000 rpm e centrifugadas a 12.000 rpm, por 20 minutos, a 4^{o}C. O sobrenadante foi coletado e a proteína quantificada, utilizando método de Bradford e a concentração final ajustada para 1 mg/ml. As amostras foram diluídas em tampão da amostra contendo 0,5 M Tris, pH 6,8; glicerol 100%, e 0,05% de azul de bromofenol. O gel de separação utilizado foi de poliacrilamida a 8% e 1% de gelatina e a corrida foi realizada com aparato Bio-Rad mini-protean, a 80 V por 2 horas, contendo tampão Tris-Glicina-SDS, pH 8,3. Após a corrida o gel foi lavado 2 vezes, por 30 minutos cada vez, em 2,5% Triton X-100 e após, em tampão tris-HCl 50 mM pH 8,4. Em seguida, o gel foi incubado por 18 horas em tampão tris-HCl 50 mM pH 8,4 com 500

mM de $CaCl_2$, em agitação contínua e à temperatura de 37°C. Após a incubação o gel foi corado com coumassie blue 2,5% por 1 hora e descorado com solução de 30% metanol e 10% ácido acético (29). Os géis foram fotografados em UVP, UV, White Darkhon e o programa utilizado para avaliar a densidade foi o Gelpro, que mede a área de digestão da gelatina em unidade de imagem denominada pixel.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis estudadas de distribuição normal são apresentadas em média e desvio-padrão. As variáveis de distribuição não normal são apresentadas em mediana e intervalo interquartil. As comparações entre os grupos foram efetuadas por teste *t de Student*, para variáveis de distribuição normal e teste U de Mann-Whitney, para variáveis de distribuição não normal.

Além disso, foi utilizado teste *t* de medidas repetidas para as variáveis analisadas dentro do mesmo grupo em dois momentos distintos (peso corporal). Para análise das relações de pressão-volume e estresse-deformação no estudo do coração isolado foi utilizado modelo de regressão linear.

Considerando-se que a variação da frequência cardíaca e o peso corporal poderiam interferir nos resultados dos parâmetros de função sistólica obtidos, foi realizado teste de análise de covariância (ANCOVA) com o intuito de corrigir os valores das variáveis estudadas de modo a anular a influência da variação do peso (peso final - peso inicial) e da frequência cardíaca entre os grupos estudados.

Admitiu-se, para todos os testes, nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Resultados morfométricos

Houve diminuição do peso corporal final dos animais do grupo Doxo (48 horas após injeção da droga) quando comparado com os mesmos animais no início do experimento, o que não ocorreu no grupo controle (figura 3). No entanto, não houve diferença no peso do VE e peso do VE corrigido pelo peso corporal (VE/PC) entre os grupos controle e Doxo (tabela 1).

Tabela 1: Dados morfométricos

	VE(g)	PCi(g)	PCf(g)	VE/PC(mg/g)
Controle	0,78 ± 0,06 (12)	329 ±14 (17)	338 ± 21 (17)	2,30 ± 0,17 (12)
Doxo	0,75 ± 0,06 (13)	333 ±16 (15)	318 ± 19 (15)	2,38 ± 0,28 (13)
Valor p	0,203	0,437	0,001	0,495

VE: ventrículo esquerdo, PCi: peso corporal antes da injeção da droga e PCf: peso corporal 48h após infusão da droga. (n): número de animais.

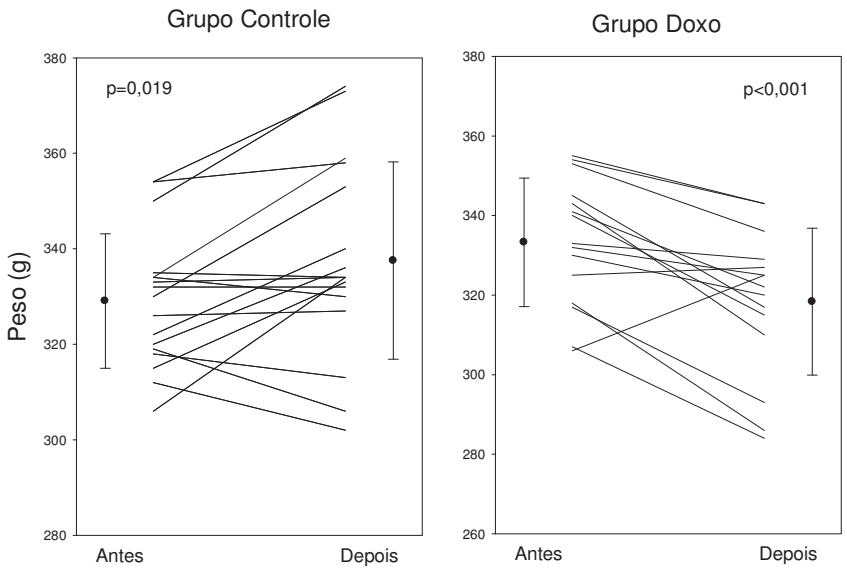

Figura 3: Peso inicial e final dos animais nos grupos controle e Doxo.

Resultados funcionais *in vivo*: ecocardiograma

Foi realizado ecocardiograma inicial para demonstrar a homogeneidade entre os grupos estudados. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 2. Não

houve diferença estatisticamente significante para nenhuma variável ecocardiográfica neste momento entre os dois grupos. A figura 4 mostra os registros ecocardiográficos obtidos de ecocardiograma inicial de animal do grupo controle.

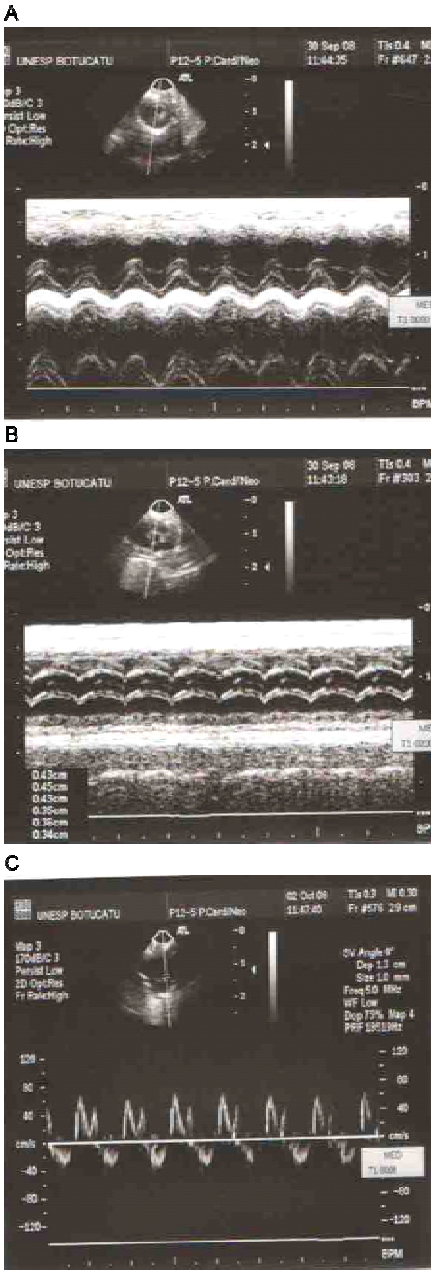

Figura 4: Imagens ecocardiográficas de animal do grupo controle.
A: imagem monodimensional do ventrículo esquerdo. B: imagem monodimensional da aorta e do átrio esquerdo. C: fluxo transmitral obtido por Doppler.

Tabela 2: Variáveis ecocardiográficas iniciais

	Controle (n=17)	Doxo (n=15)	Valor de p
FC (bpm)	318 (290-347)	307 (283-335)	0,440
AE (mm)	3,80 ± 0,53	4,10 ± 0,31	0,075
Ao (mm)	3,37 ± 0,31	3,54 ± 0,31	0,139
VSVE (mm)	2,26 ± 0,14	2,19 ± 0,16	0,179
VED (mm)	6,96 ± 0,51	7,27 ± 0,57	0,112
VES (mm)	2,98 ± 0,46	3,16 ± 0,65	0,366
PP (mm)	1,42 ± 0,16	1,38 ± 0,15	0,482
Onda E (cm/s)	72,3 (69,8-82,4)	74,7 (69,1-78,6)	0,895
Onda A (cm/s)	57,6 ± 12,8	53,9 ± 11,1	0,389
Relação E/A	1,30 (1,14-1,52)	1,37 (1,27-1,55)	0,385
TRI (ms)	19,9 ± 4,03	19,1 ± 3,14	0,568
VS (ml)	0,22 ± 0,04	0,21 ± 0,04	0,417
Fenc	0,57 ± 0,046	0,57 ± 0,063	0,805
VmaxAo (cm/s)	97,6 ± 14,7	101 ± 8,8	0,440
FE	0,92 ± 0,02	0,92 ± 0,04	0,651
DC (ml/min)	69,2 (63,8-77,0)	66,1 (57,9-71,2)	0,290

FC: frequência cardíaca, AE: átrio esquerdo, Ao: aorta, VSVE: via de saída do ventrículo esquerdo, VED: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo, VES: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo, PP: parede posterior do ventrículo esquerdo, TRI: tempo de relaxamento isovolumétrico, VS: volume sistólico, Fenc: fração de encurtamento do ventrículo esquerdo, VmaxAo: velocidade máxima na aorta, FE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo, DC: débito cardíaco.

Houve diminuição da fração de encurtamento do ventrículo esquerdo, da fração de ejeção, do volume sistólico e do débito cardíaco no grupo Doxo, 48 horas após a infusão da droga. Houve também diminuição da frequência cardíaca neste mesmo grupo, que poderia contribuir para a diminuição do débito cardíaco observada no grupo Doxo. Além disso, ocorreu aumento do tempo de relaxamento isovolumétrico, mesmo quando corrigido para a frequência cardíaca, nos animais que receberam a droga, indicando prejuízo da função diastólica neste grupo. Os resultados do ecocardiograma realizado 48 horas após a infusão da doxorrubicina são mostrados na tabela 3.

Tabela 3: Variáveis ecocardiográficas 48 horas após injeção

	Controle (n=17)	Doxo (n=15)	Valor de p
FC (bpm)	346 ± 65	301 ± 46	0,032
AE (mm)	4,22 ± 0,5	4,01 ± 0,58	0,292
Ao (mm)	3,53 ± 0,3	3,5 ± 0,21	0,714
VSVE (mm)	2,2 ± 0,12	2,3 ± 0,16	0,587
VED (mm)	7,2 ± 0,52	6,82 ± 0,64	0,08
VES (mm)	2,97 ± 0,66	3,36 ± 0,62	0,095
PP (mm)	1,31 ± 0,15	1,33 ± 0,16	0,711
Onda E (cm/s)	77,9 ± 15	68,7 ± 10,5	0,058
Onda A (cm/s)	63,2 ± 19,7	51,9 ± 14,3	0,077
Relação E/A	1,19 (1,1-1,47)	1,25 (1,17-1,53)	0,29
TRI (ms)	20,3 ± 4,3	24,7 ± 4,2	0,007
TRI corrigido	44,8 ± 4,9	49,5 ± 4,3	0,007
Fenc	0,59 ± 0,07	0,51 ± 0,05	<0,001
VmaxAo (cm/s)	96,0 ± 10,3	80,9 ± 11,3	<0,001
FE	0,93 ± 0,03	0,88 ± 0,04	<0,001
VS (ml)	0,21 ± 0,03	0,18 ± 0,05	0,039
DC (ml/min)	72,7 ± 11,7	55,3 ± 16,4	0,002

FC: frequência cardíaca, AE: átrio esquerdo, Ao: aorta, VSVE: via de saída do ventrículo esquerdo, VED: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo, VES: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo, PP: parede posterior do ventrículo esquerdo, TRI: tempo de relaxamento isovolumétrico, VS: volume sistólico, Fenc: fração de encurtamento do ventrículo esquerdo, VmaxAo: velocidade máxima na aorta, FE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo, DC: débito cardíaco.

Como houve diferença estatisticamente significante na frequência cardíaca e no peso corporal entre os grupos e estas variáveis poderiam interferir nos parâmetros de avaliação da função sistólica, os valores foram ajustados pela análise de covariância, conforme mostrado na tabela 4. Os resultados obtidos de débito cardíaco, de fração de encurtamento e de fração de ejeção foram influenciados pela frequência cardíaca, mas foi mantida diferença estatisticamente significante mesmo após correção. A variação de peso não influenciou nenhuma das variáveis analisadas.

Tabela 4: Variáveis ecocardiográficas 48 horas após infusão da droga, ajustadas pela variação de peso e pela frequência cardíaca (ANCOVA).

	Controle (n=17)	Doxo (n=15)	Valor de p
Fenc	0,59 ± 0,02*	0,52 ± 0,02	0,011
FE	0,93 ± 0,01	0,88 ± 0,01	0,003
DC (ml/min)	70,9 ± 3,49	57,4 ± 3,79	0,028

Fenc: fração de encurtamento do ventrículo esquerdo, FE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo, DC: débito cardíaco. *Valores expressos em média e erro padrão.

Resultados funcionais *in vitro*: estudo do coração isolado

Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos no volume inicial do balão intraventricular, que determinava pressão diastólica final de zero (Controle: 127 ± 31 µl X Doxo: 155 ± 41 µl; p=0,175), não havendo, portanto, diferença no tamanho diastólico da cavidade do ventrículo esquerdo.

Para análise das derivadas positiva e negativa foi considerado o maior e o menor valor, respectivamente. No estudo do coração isolado, o valor da derivada de pressão positiva e a relação pressão-volume sistólica, bem como a relação estresse-deformação sistólica foram semelhantes entre os grupos, evidenciando que a doxorrubicina não foi capaz de induzir disfunção sistólica nos ratos tratados. Já com relação à função diastólica, apesar da derivada de pressão negativa e da relação pressão-volume diastólica (figura 5) serem semelhantes entre os grupos, houve diferença na variação de deformação para obter estresse de 20 g/cm^2, que foi menor no grupo Doxo, caracterizando maior rigidez passiva miocárdica no grupo tratado (Controle: 14,7 ± 1,5 % vs Doxo: 12 ± 2,2 %; p<0,05), conforme ilustrado na figura 5. A tabela 5 mostra os resultados dos parâmetros funcionais obtidos no estudo do coração isolado.

Tabela 5: Dados de função ventricular esquerda nos grupos controle e Doxo

	Controle	**Doxo**	**Valor de p**
+dP/dt (mmHg/s)	3471 ± 899 (12)	3359 ± 950 (13)	0,811
-dP/dt (mmHg/s)	2328 ± 438 (12)	2078 ± 377 (13)	0,242
RPVsist (mmHg/µl)	452 ± 262 (5)	400 ± 132 (7)	0,700
RPVdiast (mmHg/µl)	346 ± 153 (7)	323 ± 95 (7)	0,726
SSsist (g/cm^2/ µl)	4,74 ± 0,45 (5)	5,23 ± 0,90 (6)	0,286
Log SSdiast (g/cm2/ µl)	0,130 ± 0,04 (7)	0,137 ± 0,03 (7)	0,705

+dP/dt e –dP/dt: primeira derivada temporal da pressão sistólica e diastólica, respectivamente. RPVsist: obtida pela inclinação (regressão linear) da reta da relação pressão sistólica-volume diastólico do ventrículo esquerdo. RPVdiast: obtida pela inclinação (regressão linear) da função logarítmica da relação pressão-volume diastólica. SSsist: relação estresse-deformação sistólica. Log SSdiast: função logarítmica da relação estresse-deformação diastólica. (n) número de animais.

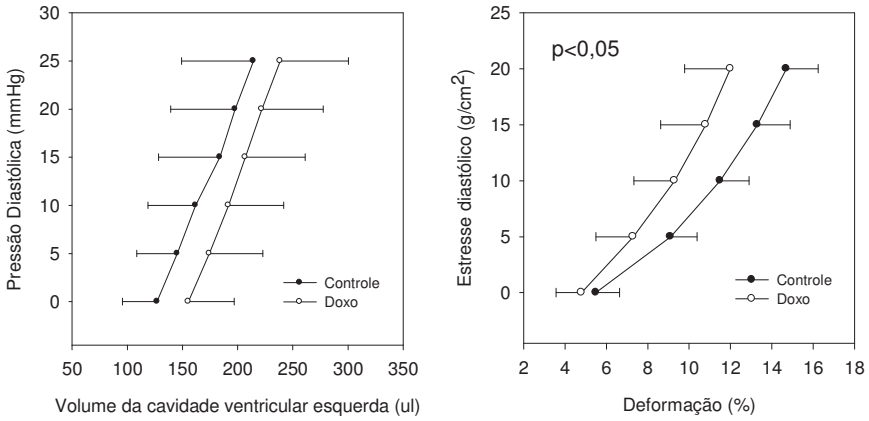

Figura 5: Relação pressão-volume diastólica e estresse-deformação diastólica

Resultados histológicos

A análise histológica das amostras coradas por hematoxilina-eosina (HE), por sua vez, não identificou alterações na estrutura do miocárdio, tamanho dos miócitos ou do tecido intersticial, bem como excluiu a presença de infiltrado inflamatório perivascular e necrose celular, quando se comparou o grupo controle com o grupo Doxo (figura 6).

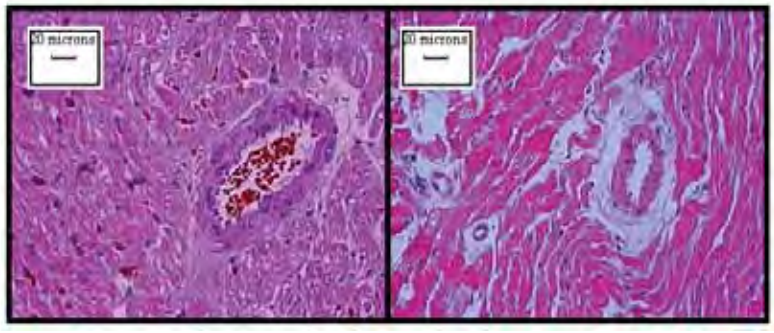

Figura 6: Músculo cardíaco corado com hematoxilina-eosina

À esquerda, grupo controle e à direita, grupo Doxo.

Também não houve diferença na fração de colágeno intersticial mensurado nas lâminas coradas com Picrosirius red (Controle: 3,43% ± 1,16% vs Doxo: 3,82% ± 1,63%; p=0,257). A figura 7 ilustra lâmina corada com Picrosirius red visualizada com luz polarizada.

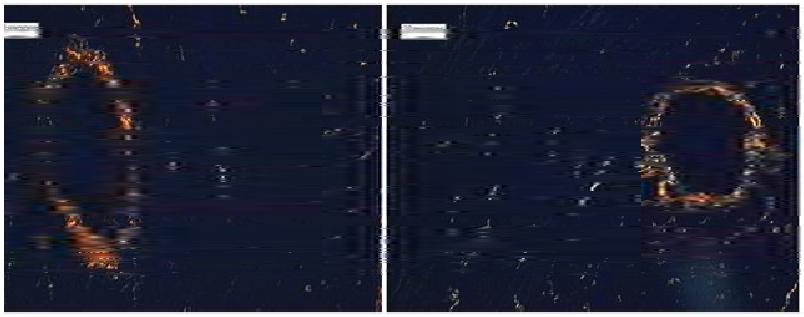

Figura 7: Coloração Picrosirius red visualizada com luz polarizada.
À esquerda, grupo controle e à direita, grupo Doxo.

Dosagem das citocinas inflamatórias e moléculas de adesão

Não houve diferença, entre os grupos estudados, na concentração de interleucina-10, fator de necrose tumoral-α, interferon-γ e na molécula de adesão ICAM-1 cardíacos. Todos os resultados foram ajustados para a quantidade total de proteína de cada amostra. A tabela 6 mostra os resultados da quantificação pelo método ELISA.

Tabela 6: Valores de molécula de adesão e citocinas inflamatórias quantificada pelo método ELISA.

	Controle (n=5)	Doxo (n=5)	Valor de p
TNF-α	5,07 ± 1,09	5,78 ± 2,11	0,520
IFN-γ	7,90 ± 1,75	8,92 ± 2,07	0,424
IL-10	10,8 ± 3,30	12,3 ± 3,77	0,536
ICAM-1	65,7 ± 10,52	54,5 ± 10,9	0,192

Valores expressos em pg/mg de proteína do tecido, em média ± desvio-padrão. TNF-α: fator de necrose tumoral-α, IFN-γ: interferon-γ, IL-10: interleucina-10, ICAM-1: molécula de adesão intercelular-1.

Resultados da zimografia

Foi avaliada atividade colagenolítica das metaloproteinases 2 e 9 no miocárdio dos ratos estudados através de eletroforese (figura 8) e quantificação da degradação da gelatina incorporada no gel por análise de densidade óptica (figura 9). No gel de eletroforese foram identificadas duas bandas de degradação correspondentes à metaloproteinase 2: a metaloproteinase 2 inativa (pró-MMP-2) com peso molecular de aproximadamente 72 KDa e a forma ativa apresenta peso molecular de aproximadamente 64 KDa (30). É possível ainda identificar banda de degradação intermediária entre as duas últimas citadas. A metaloproteinase 9 foi visualizada em apenas uma banda, na sua forma ativa, com peso molecular de aproximadamente 92 KDa.

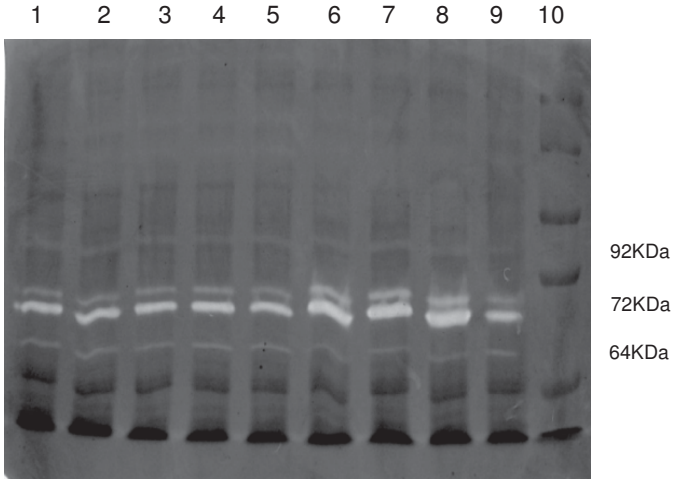

Figura 8: Gel de eletroforese
Gel com degradação da gelatina (em branco). Colunas 1, 2, 3, 4 e 5: grupo Doxo. Colunas 6, 7, 8 e 9: grupo controle. Coluna 10: padrão. À direita, peso molecular aproximado das bandas de degradação da gelatina. MMP-9: 92 KDa, MMP-2 inativa: 72 KDa e MMP-2 ativa: 64 KDa.

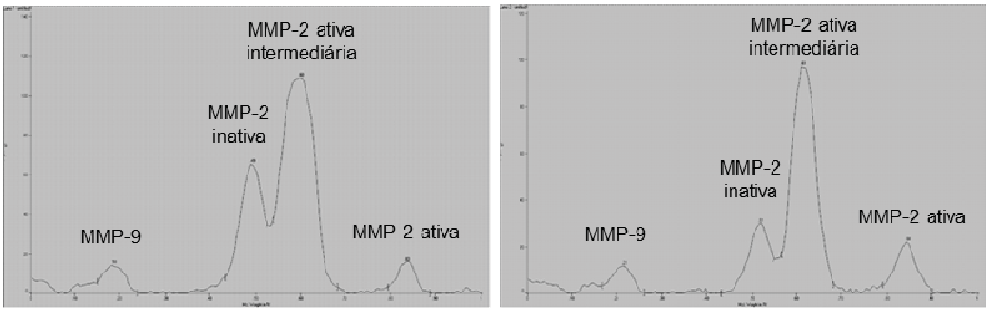

Figura 9: Atividade colagenolítica por densitometria óptica no tecido cardíaco
À esquerda, grupo controle e à direita, grupo Doxo.

O grupo controle exibiu maior quantidade de metaloproteinase total, metaloproteinase 2 inativa e ativa intermediária que o grupo tratado, no entanto, o grupo tratado com doxorrubicina apresentou maior quantidade de metaloproteinase 2 ativa (tabela 7). Quando realizada relação entre metaloproteinase 2 ativa e metaloproteinase 2 inativa, evidenciou-se aumento de atividade da metaloproteinase 2 no grupo tratado (figura 10). Também houve aumento de atividade das metaloproteinases 2 e 9 após normalização pela quantidade total de metaloproteinase (figura 11).

Tabela 7: Valores de densidade óptica correspondentes à degradação do gel para ambos os grupos.

	Grupo Controle (n=4)	**Grupo Doxo (n=5)**	**Valor de p**
MMP-2 inativa	40212 (31730-46509)	19066 (18454-19830)	0,016
MMP-2 ativa intermediária	104500 (87197-108000)	67967 (67423-70340)	0,032
MMP-2 ativa	8301 ± 1032	11891 ± 1344	0,003
MMP-9	7007 ± 2681	7494 ± 823	0,708
MMP total	161272 (135485-168565)	107359(104406-109548)	0,032

MMP: metaloproteinase. (n): número de animais. Valores expressos em média ± desvio-padrão ou mediana (primeiro quartil-terceiro quartil).

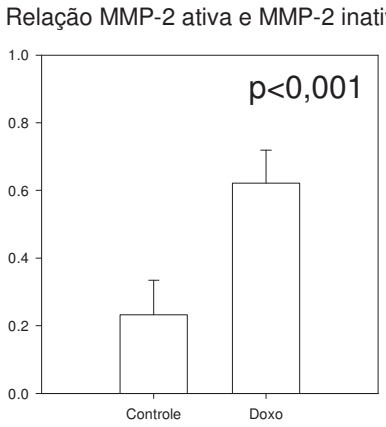

Figura 10: Relação entre metaloproteinase 2 ativa e metaloproteinase 2 inativa

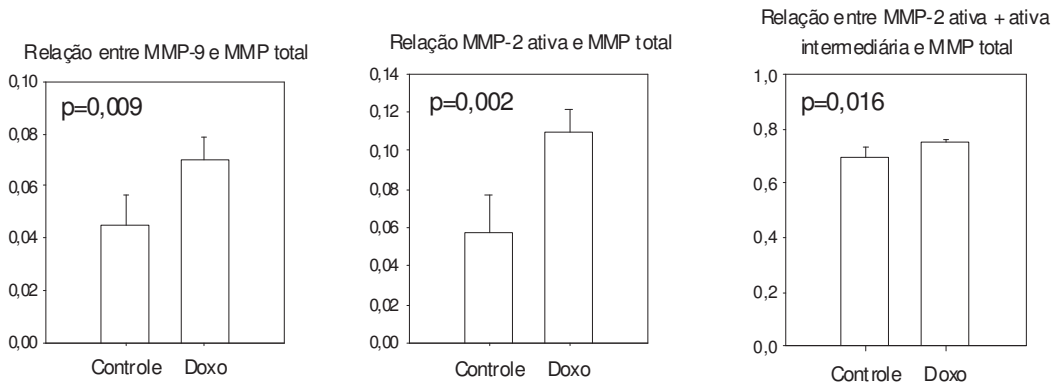

Figura 11: Relação entre metaloproteinases 2 e 9 e metaloproteinase total.

Resultados da RT-PCR

Ambos os grupos estudados apresentaram expressão gênica estatisticamente semelhante de fosfolamban, Serca-2a e receptor rianodínico. Os valores de expressão de RNAm foram normalizados pelos valores de expressão do gene de controle endógeno (ciclofilina), para cada amostra (ΔCt). Os valores de ΔΔCt foram obtidos a partir da diferença entre os ΔCt de cada amostra e a média dos ΔCt dos

controles. A figura 12 ilustra as curvas de amplificação obtidas e a tabela 8 mostra os resultados da RT-PCR.

Tabela 8: Resultados de expressão gênica para as proteínas reguladoras do trânsito de cálcio 48 horas após tratamento com doxorrubicina.

Gene	Controle (n=5)	Doxo (n=5)	Valor de p
Fosfolamban	1,138 ± 0,560	1,169 ± 0,466	0,926
Serca 2a	1,501 ± 1,561	1,620 ± 0,828	0,885
Receptor rianodínico	1,382 ± 1,246	2,018 ± 0,969	0,394

Valores expressos em média ± desvio-padrão.

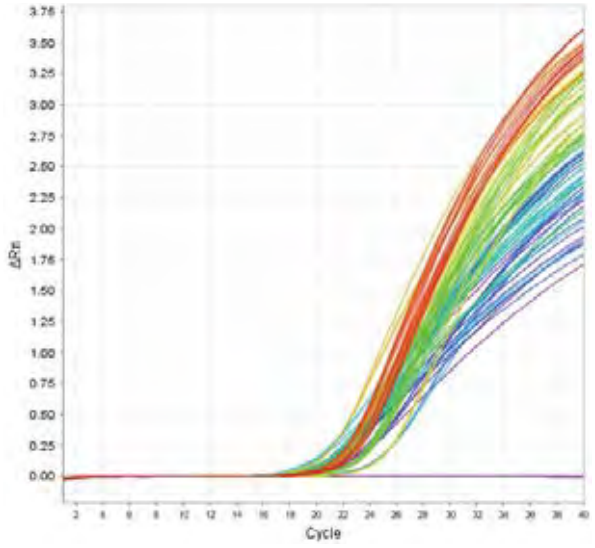

Figura 12: Curvas de amplificação de RNA obtidas após RT-PCR.

Cada amostra é representada em cor diferente na figura e cada uma delas foi amplificada em triplicata. O eixo horizontal representa o número de ciclos de amplificação a que as amostras foram submetidas e o eixo vertical representa a quantidade de RNA formado.

DISCUSSÃO

A cardiotoxicidade pela doxorrubicina é um processo contínuo que se inicia imediatamente após a aplicação da droga. No nosso estudo observamos precocemente prejuízo da função sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo e ativação das metaloproteinases 2 e 9. Essas alterações não foram relacionadas ao processo inflamatório, à alteração no colágeno intersticial ou à expressão das proteínas reguladoras do trânsito de cálcio.

Devido à necessidade de investigação da fisiopatologia, dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da toxicidade e da pesquisa de métodos para minimizar a lesão miocárdica induzida pela doxorrubicina foram criados vários modelos animais para o estudo dessa droga. Já está bem descrito na literatura o uso do rato como modelo de desenvolvimento de cardiotoxicidade (31, 32). Esse modelo apresenta como vantagens ser de fácil manejo e necessitar de menor quantidade de droga para infusão, diminuindo custos (33). A dose utilizada de doxorrubicina no nosso estudo é considerada uma dose alta e se mostrou efetiva em produzir alterações cardíacas em vários estudos experimentais prévios, como dilatação ventricular, aumento da expressão de metaloproteinases e aumento do estresse oxidativo (23, 25, 34, 35).

A doxorrubicina é um quimioterápico com moderado potencial de induzir náuseas e vômitos, com 30 a 90% de incidência destes sintomas nos pacientes tratados (36), o que poderia levar à diminuição da ingestão de água e alimentos. Os ratos no nosso experimento tratados com doxorrubicina apresentaram redução do peso corporal em relação a eles mesmos no início do experimento e também em relação ao grupo controle 48 horas após o tratamento. Como houve diminuição do peso corporal num período curto de tempo, provavelmente essa redução deveu-se à desidratação dos animais e não à diminuição da massa magra corporal por diminuição da ingestão alimentar. No presente estudo não foi possível mensurar a

ingestão de água e ração, pois os ratos foram mantidos em gaiolas coletivas. Estes resultados estão de acordo com outros encontrados na literatura, que mostram perda de peso na primeira semana após tratamento, mesmo com dose menor de doxorrubicina administrada em bolus (31, 32). Este dado é extremamente relevante, pois a desidratação reduz a pré-carga e pode aumentar a pós-carga devido à vasoconstrição, interferindo nos resultados obtidos de função ventricular *in vivo*.

A avaliação da função diastólica através do ecocardiograma nos ratos apresenta dificuldades devido à alta frequência cardíaca apresentada por esses animais, prejudicando a mensuração do fluxo transmitral e a obtenção dos valores de onda A e E ao Doppler (32). No entanto, no presente estudo, houve tendência de diminuição das ondas A e E ($p=0,077$ e $p=0,058$, respectivamente) no grupo tratado com doxorrubicina, mas que não foi estatisticamente significante. A redução concomitante das ondas E e A não caracteriza nenhum padrão conhecido de disfunção diastólica (alteração de relaxamento, padrão pseudonormal ou restritivo) e pode ter ocorrido devido à redução da pré-carga pela possível desidratação (37).

Outro parâmetro de avaliação da função diastólica é o tempo de relaxamento isovolumétrico (38), que é o período de tempo entre o fechamento da valva aórtica e a abertura da valva mitral, no qual o ventrículo não altera seu volume. Este parâmetro ecocardiográfico é influenciado pela frequência cardíaca e pelas características intrínsecas do músculo cardíaco (fibrose, hipertrofia), além do suprimento de ATP e trânsito de cálcio. Nas situações em que ocorre diminuição da pré-carga espera-se diminuição do tempo de relaxamento isovolumétrico (37). Ao contrário, nos nossos animais, houve aumento do tempo de relaxamento isovolumétrico no grupo Doxo, caracterizando déficit de relaxamento e, consequentemente, disfunção diastólica.

As alterações ecocardiográficas observadas nas variáveis relacionadas à função sistólica ao ecocardiograma (fração de encurtamento do ventrículo esquerdo, débito cardíaco e fração de ejeção) poderiam ser justificadas por alterações hemodinâmicas presentes no animal vivo, já que essas variáveis são dependentes do estado volêmico, da pressão arterial e da frequência cardíaca do animal. Houve diminuição da frequência cardíaca no grupo doxorrubicina e provável desidratação, conforme já descrito anteriormente, o que poderia culminar com a diminuição do débito cardíaco. Apesar disso, o débito cardíaco manteve-se diminuído mesmo quando esta variável foi ajustada pela variação de peso corporal e pela frequência cardíaca (ANCOVA). O mesmo ocorreu para a fração de encurtamento e a fração de ejeção do ventrículo esquerdo, demonstrando que os ratos tratados com doxorrubicina apresentaram, também, disfunção sistólica. Em situações de desidratação, supõe-se que haja diminuição da cavidade ventricular esquerda, tanto na sístole quanto na diástole. No entanto, nos animais tratados observamos tendência a aumento do ventrículo esquerdo na sístole, possivelmente decorrente de aumento do volume residual ao final da sístole por diminuição do volume ejetado. Estudos prévios que avaliaram agudamente a função ventricular esquerda após altas doses de doxorrubicina em modelos experimentais com camundongos são controversos com relação ao diâmetro do ventrículo esquerdo. Estudo prévio demonstrou diminuição da cavidade ventricular esquerda na diástole e na sístole, em 2 e 4 dias, respectivamente, após infusão de doxorrubicina, com manutenção da fração de encurtamento (19). Outro estudo mostrou diminuição do diâmetro diastólico e da fração de encurtamento do ventrículo esquerdo 5 dias após infusão da droga (35). Em outro estudo houve aumento dos diâmetros sistólico e diastólico do ventrículo esquerdo 24 horas após a infusão de dose única de doxorrubicina (25).

Outra alteração hemodinâmica que pode ocorrer após infusão da doxorrubicina é diminuição da pressão arterial sistêmica, conforme já descrito na literatura (22, 32). No entanto, não foi aferida pressão arterial dos animais estudados, o que poderia fornecer dado adicional ao comportamento hemodinâmico nos ratos tratados.

O método de estudo do coração isolado foi descrito por Langendorff em 1985 e desde então vem sendo utilizado para avaliação da função cardíaca em diversos modelos experimentais (39). Em modelos de cardiotoxicidade crônica e aguda induzidas pela doxorrubicina é utilizado com o intuito de comparar as diversas drogas da classe das antraciclinas e avaliar possíveis substâncias que minimizariam a cardiotoxicidade (40). Dentre as variáveis avaliadas por esse método encontra-se a derivada pressão-tempo positiva que se relaciona com a função sistólica e a negativa que se relaciona com a função diastólica. No presente estudo, não foi evidenciada alteração nas derivadas positiva e negativa. Foi realizada regressão linear para avaliação da relação pressão-volume sistólica e diastólica e não foi encontrada diferença no coeficiente de inclinação das retas entre os grupos para ambas as relações. No entanto, evidenciamos que houve deslocamento da curva de relação estresse-deformação diastólica para cima e para a esquerda. O estresse parietal refere-se à força por unidade de área seccional transversa. Deformação, por sua vez, é definida como a modificação da forma de um tecido quando a ele é aplicada uma força, sendo capaz de avaliar a intensidade de deformação que o miocárdio apresenta durante o ciclo cardíaco. Pela Lei de Frank-Starling, essa correlação é direta, ou seja, o aumento do estresse parietal deve ser acompanhado de aumento da deformação miocárdica. Portanto, a correlação dessas duas variáveis representa as propriedades elásticas intrínsecas do músculo cardíaco, ou seja, o grau de rigidez miocárdica. Como houve deslocamento da curva do grupo

Doxo para cima e para a esquerda, podemos concluir que o grupo tratado apresenta maior rigidez miocárdica que o grupo controle. Não houve diferença entre os grupos que pudesse caracterizar disfunção sistólica no estudo do coração isolado.

O aumento da rigidez miocárdica poderia ser secundário a aumento do depósito de colágeno intersticial, mas no nosso estudo não houve diferença na quantidade de colágeno intersticial entre os grupos, portanto, o aumento da rigidez não ocorreu por este mecanismo. O edema intersticial que pode ocorrer pelo aumento da permeabilidade após infusão da droga também poderia contribuir para aumento da rigidez diastólica. No nosso estudo não foi mensurado o teor de água tecidual no coração dos ratos e não pudemos confirmar ou excluir essa hipótese.

Ainda é possível que a rigidez miocárdica aumentada possa ser explicada por alterações na contratilidade e relaxamento do músculo cardíaco, que por sua vez é dependente da homeostase intracelular do cálcio. O cálcio é um íon essencial para o processo de contração-relaxamento, ligando-se à troponina C e permitindo a interação actina-miosina. Seu fluxo é regulado por 3 sistemas de membranas (mitocondrial, plasmática e do retículo sarcoplasmático) e pelas proteínas nelas inseridas. O processo de contração inicia-se com o estímulo elétrico gerando influxo pequeno e lento de cálcio para o interior da célula através dos canais L na membrana citoplasmática. Esse aumento de cálcio ativa o receptor rianodínico no retículo sarcoplasmático, que leva à liberação de grande quantidade de cálcio para o citosol, caracterizando a fase de contração muscular. O relaxamento inicia-se quando a bomba de membrana do retículo sarcoplasmático, cálcio ATPase-dependente (Serca2a), começa a recaptar o cálcio para o interior do retículo sarcoplasmático. A atividade da Serca2a é regulada por uma série de fatores, incluindo o fosfolamban, proteína que sofre fosforilação, muda sua conformação e ativa a Serca2a. A fosforilação do fosfolamban acontece em resposta a vários

estímulos intracelulares, como AMP cíclico, estímulo β-adrenérgico, calmodulina e a própria concentração do íon cálcio.

Aparentemente, o déficit contrátil crônico decorrente da cardiotoxicidade da doxorrubicina é, em grande parte, decorrente da alteração da dinâmica intracelular do cálcio (41, 42). Há indícios na literatura que esta alteração ocorre precocemente após exposição à droga em cardiomiócitos isolados de ratos e músculo papilar isolado (43, 44). Apesar de alguns estudos revelarem que, agudamente, na agressão miocárdica pela doxorrubicina possa haver depleção do cálcio intracelular (5), outros estudos demonstram que a doxorrubicina aumenta a concentração de cálcio no citoplasma de cardiomiócitos isolados de ratos, através de aumento da liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático (43). Além disso, pode aumentar o influxo de cálcio na mitocôndria, provocando aumento da formação de espécies reativas de oxigênio e aumento da liberação de citocromo C, aumentando a taxa de apoptose nestas células (43). As alterações agudas do cálcio poderiam estar relacionadas às manifestações clínicas agudas provocadas pela doxorrubicina, que são as alterações eletrocardiográficas. No entanto, pode ser que o aumento do cálcio citosólico seja apenas consequência de outros mecanismos indutores de dano celular e não o desencadeante inicial da lesão miocárdica e outros distúrbios possam preceder a alteração no fluxo de cálcio como, por exemplo, disfunção da cadeia respiratória com formação de espécies reativas de oxigênio (45) ou inibição da fosfolipase A2 cálcio-independente na membrana celular (46).

Como em outras formas de insuficiência cardíaca, na cardiotoxidade crônica induzida pela doxorrubicina ocorre diminuição da expressão de RNAm de proteína Serca2a, fosfolamban e receptor rianodínico, conforme observado em estudo experimental realizado em coelhos avaliados cronicamente após infusão de doxorrubicina (22). Não há dados na literatura a respeito da expressão destas

proteínas na cardiotoxicidade aguda induzida pela doxorrubicina. No nosso estudo, não foi observada alteração da expressão de RNAm para fosfolamban, receptor rianodínico e Serca2a. A expressão semelhante entre os dois grupos não descarta a possibilidade das alterações no trânsito do cálcio estarem envolvidas no prejuízo do relaxamento miocárdico detectado no nosso estudo, visto que poderia haver alterações pós-transcricionais, alterações qualitativas na função destas proteínas ou alteração da concentração do cálcio não dependente da liberação pelo retículo sarcoplasmático, já que as vias intracelulares envolvidas na regulação do cálcio são múltiplas (47).

A resposta inflamatória também é citada na literatura como possivelmente envolvida na gênese da toxicidade cardíaca doxorrubicina-induzida, que não só mediaria apoptose, como também o processo de remodelação miocárdica (14). Diferentemente do que ocorre em outros tipos de insuficiência cardíaca, onde há aumento dos níveis séricos de TNF-α e da expressão gênica para esta citocina inflamatória, os resultados obtidos no modelo de cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina ainda são conflitantes. Ao passo que alguns estudos experimentais no modelo de toxicidade crônica em ratos mostram aumento da expressão de RNAm para TNF-α (48) e IL-1 (12), outros não revelam alteração nos níveis séricos ou na expressão de RNAm para TNF-α (14). Os diferentes resultados encontrados na literatura talvez possam ser explicados devido aos diferentes modelos experimentais utilizados em cada estudo, no qual a infusão de altas doses em uma única aplicação cursa com maior quantidade de genes expressos, voltando à expressão normal destes genes após o período de meia vida da droga, que é em torno de 48 horas no músculo cardíaco, enquanto a infusão de baixas doses em múltiplas aplicações leva à ativação de menor quantidade de genes, mas com um perfil de ativação gênica que simularia o encontrado na toxicidade crônica em humanos (49).

O TNF-α é citocina liberada pelos linfócitos T, principalmente na fase aguda da inflamação (4 a 6 horas após gatilho inflamatório), e sua principal função é aumentar a expressão das moléculas ligantes de integrinas (ICAM-1, VCAM-1) na superfície celular, aumentando o recrutamento e ligação de leucócitos ao endotélio vascular. Além disso, estimula produção de outras citocinas inflamatórias, promove ativação de neutrófilos e aumenta a capacidade trombogênica do endotélio. O IFN-γ também é citocina inflamatória produzida pelos linfócitos T ativados, relacionada mais especificamente com a fase crônica da inflamação (dias após gatilho inflamatório inicial), e induz diferenciação de macrófagos em células gigantes, aumenta a apresentação de antígenos e estimula produção de outras citocinas inflamatórias. A IL-10 é produzida por linfócitos T, macrófagos e monócitos com a finalidade de regular e/ou inibir a resposta inflamatória, sendo uma citocina anti-inflamatória.

Não houve alteração na concentração tecidual de TNF-α, IFN-γ ou IL-10 no presente estudo, bem como não ocorreu alteração nos níveis de ICAM-1. Nossos resultados reproduziram outros já presentes na literatura, no qual ratos tratados com doxorrubicina (15 mg/kg) foram sacrificados com 1, 2, 4 e 24 horas após dose total administrada e não houve diferença nos níveis de TNF-α sérico ou na sua expressão tecidual em qualquer dos momentos avaliados (14). O papel do TNF-α no mecanismo de toxicidade cardíaca da doxorrubicina talvez esteja relacionado mais com a “qualidade” de resposta ao TNF-α que com a “quantidade” de TNF-α expresso ou liberado nos tecidos, através de sua ligação em diferentes tipos de receptores de membrana, que determinam estímulo de apoptose ou estímulo de sobrevivência celular (13).

As citocinas inflamatórias, principalmente IL-1 e TNF-α, constituem importante indutor de remodelação cardíaca, interferindo nas características da matriz extracelular, também por ativarem metaloproteinases (17).

As metaloproteinases são enzimas proteolíticas, zinco-dependentes, que são produzidas na forma de pró-enzimas, e são ativadas com a clivagem do propeptídeo terminal com exposição do íon zinco (30). As metaloproteinases estão envolvidas na degradação dos componentes da matrix extracelular e, por isso, são essenciais para a manutenção normal dos tecidos. Podem ter sua quantidade e/ou atividade aumentada em resposta a diversos estímulos, como ativação neuro-hormonal (angiotensina II e norepinefrina), estresse oxidativo, aumento de trombospondina e osteopontina, estímulos mecânicos (aumento de pressão transmural ou da deformação miocárdica) e resposta inflamatória (17). As metaloproteinases 2 e 9, também denominadas gelatinases, possuem alta afinidade pelo colágeno fibrilar, colágeno IV, fibronectina e laminina. São encontradas naturalmente no miocárdio, mas em situações de agressão, como isquemia e sobrecargas de pressão ou volume, essas enzimas são mais ativadas (17).

No presente estudo houve ativação de metaloproteinase 2 e 9 no miocárdio dos ratos tratados com doxorrubicina 48 horas após exposição à droga e a ativação não está relacionada a aumento da atividade inflamatória. Os resultados obtidos são similares aos encontrados na literatura, que mostram aumento da expressão de metaloproteinase 2 no miocárdio de camundongos tratados com doxorrubicina no dia 1 e 2 após exposição à droga e aumento da expressão de metaloproteinase 9 nos dias 2 e 4 após a exposição (19).

Apesar de, classicamente, as metaloproteinases estarem relacionadas com a degradação da matriz extracelular, a metaloproteinase 2 também tem efeitos intracelulares e sua ativação pode estar relacionada à modulação de estresse

oxidativo. Quando ativada, esta enzima tem afinidade por uma série de proteínas intracelulares, incluindo as proteínas contráteis troponina I, α-actina e miosina de cadeia leve, resultando em alteração da contratilidade miocárdica (50, 51). Isto é extremamente interessante, já que sabidamente um dos mecanismos iniciais da lesão miocárdica pela doxorrubicina é o aumento do estresse oxidativo e nossos ratos apresentaram disfunção ventricular diastólica e sistólica.

O tipo mais comum de cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina é o que se manifesta como miocardiopatia dilatada e quadro típico de insuficiência cardíaca, observado meses após tratamento com a droga, também denominado cardiotoxicidade crônica. Apesar desta denominação, a ativação de metaloproteinases observada no nosso estudo, leva a crer que o processo de remodelação, que culmina em dilatação ventricular esquerda, inicia-se precocemente após tratamento com doxorrubicina.

CONCLUSÕES

- A ativação das metaloproteinases ocorre precocemente no miocárdio dos ratos tratados com doxorrubicina.
- Ocorre aumento da rigidez passiva miocárdica *in vitro* e disfunção diastólica e sistólica *in vivo* neste modelo experimental.
- A disfunção cardíaca não está relacionada à alteração na expressão de RNAm para Serca-2a, receptor rianodínico ou fosfolamban.
- Não há aumento da inflamação no miocárdio após a infusão de doxorrubicina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tan C, Tasaka H, Yu KP, Murphy ML, Karnofsk DA. Daunomycin an antitumor antibiotic in treatment of neoplastic disease - clinical evaluation with special reference to childhood leukemia. Cancer. 1967;20(3):333-53.
2. Smith LA, Cornelius VR, Plummer CJ, Levitt G, Verrill M, Canney P, et al. Cardiotoxicity of anthracycline agents for the treatment of cancer: Systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. BMC Cancer. 2010;10:337.
3. Menna P, Salvatorelli E, Minotti G. Doxorubicin degradation in cardiomyocytes. J Pharmacol Exp Ther. 2007;322(1):408-19.
4. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. Pharmacol Rev. 2004;56(2):185-229.
5. Ferreira AL, Matsubara LS, Matsubara BB. Anthracycline-induced cardiotoxicity. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem. 2008;6(4):278-81.
6. Wojtacki J, Lewicka-Nowak E, Lesniewski-Kmak K. Anthracycline-induced cardiotoxicity: clinical course, risk factors, pathogenesis, detection and prevention--review of the literature. Med Sci Monit. 2000;6(2):411-20.
7. Allen A. The cardiotoxicity of chemotherapeutic drugs. Semin Oncol. 1992;19(5):529-42.
8. Shi Y, Moon M, Dawood S, McManus B, Liu PP. Mechanisms and management of doxorubicin cardiotoxicity. Herz. 2011;36(4):296-304.
9. Childs AC, Phaneuf SL, Dirks AJ, Phillips T, Leeuwenburgh C. Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2 : Bax ratio. Cancer Res. 2002;62(16):4592-8.

10. Chen B, Peng XY, Pentassuglia L, Lim CC, Sawyer DB. Molecular and cellular mechanisms of anthracycline cardiotoxicity. Cardiovasc Toxicol. 2007;7(2):114-21.
11. Kim Y, Ma AG, Kitta K, Fitch SN, Ikeda T, Ihara Y, et al. Anthracycline-induced suppression of GATA-4 transcription factor: implication in the regulation of cardiac myocyte apoptosis. Mol Pharmacol. 2003;63(2):368-77.
12. Zhu JZ, Zhang J, Xiang D, Zhang ZH, Zhang L, Wu MY, et al. Recombinant human interleukin-1 receptor antagonist protects mice against acute doxorubicin-induced cardiotoxicity. Eur J Pharmacol. 2010;643(2-3):247-53.
13. Chiosi E, Spina A, Sorrentino A, Romano M, Sorvillo L, Senatore G, et al. Change in TNF-alpha receptor expression is a relevant event in doxorubicin-induced H9c2 cardiomyocyte cell death. J Interferon Cytokine Res. 2007;27(7):589-97.
14. Singal PK, Lou H, Danelisen I. Cytokines are not upregulated in adriamycin-induced cardiomyopathy and heart failure. J Mol Cell Cardiol. 2004;36(5):683-90.
15. Bozkurt B, Kribbs SB, Clubb FJ, Michael LH, Didenko VV, Hornsby PJ, et al. Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor-alpha promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats. Circulation. 1998;97(14):1382-91.
16. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. Cardiovasc Res. 2006;69(3):562-73.
17. Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. Physiol Rev. 2007;87(4):1285-342.
18. Dazzi H, Kaufmann K, Follath F. Anthracycline-induced acute cardiotoxicity in adults treated for leukaemia - Analysis of the clinico-pathological aspects of documented acute anthracycline-induced cardiotoxicity inpatients treated for

acute leukaemia at the University Hospital of Zurich, Switzerland, between 1990 and 1996. Ann Oncol. 2001;12(7):963-6.

19. Kizaki K, Ito R, Okada M, Yoshioka K, Uchide T, Temma K, et al. Enhanced gene expression of myocardial matrix metalloproteinases 2 and 9 after acute treatment with doxorubicin in mice. Pharmacol Res. 2006;53(4):341-6.
20. Chow AK, Cena J, Schulz R. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. Brit J Pharmacol. 2007;152(2):189-205.
21. Vinay Kumar M, Abbas AK, Fausto N, Mitchell R. Robbins Basic Pathology. 8th edition ed: Elsevier; 2007. p. 960.
22. Arai M, Tomaru K, Takizawa T, Sekiguchi K, Yokoyama T, Suzuki T, et al. Sarcoplasmic reticulum genes are selectively down-regulated in cardiomyopathy produced by doxorubicin in rabbits. J Mol Cell Cardiol. 1998;30(2):243-54.
23. Buyukokuroglu ME, Taysi S, Buyukavci M, Bakan E. Prevention of acute adriamycin cardiotoxicity by dantrolene in rats. Hum Exp Toxicol. 2004;23(5):251-6.
24. Ascensao A, Ferreira R, Oliveira PJ, Magalhaes J. Effects of endurance training and acute Doxorubicin treatment on rat heart mitochondrial alterations induced by in vitro anoxia-reoxygenation. Cardiovasc Toxicol. 2006;6(3-4):159-72.
25. Toko H, Oka T, Zou Y, Sakamoto M, Mizukami M, Sano M, et al. Angiotensin II type 1a receptor mediates doxorubicin-induced cardiomyopathy. Hypertens Res. 2002;25(4):597-603.
26. De Stefano LM, Matsubara LS, Matsubara BB. Myocardial contractility of the isovolumetrically beating isolated rat heart. Braz J Med Biol Re. 2004;37(10):1563-9.

27. Matsubara LS, Narikawa S, Ferreira AL, Paiva SA, Zornoff LM, Matsubara BB. Myocardial remodeling in chronic pressure or volume overload in the rat heart. Arq Bras Cardiol. 2006;86(2):126-30.
28. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001; 29(9):e45
29. Tyagi SC, Matsubara L, Weber KT. Direct extraction and estimation of collagenase(s) activity by zymography in microquantities of rat myocardium and uterus. Clin Biochem. 1993;26(3):191-8.
30. Schulz R, Kandasamy AD, Chow AK, Ali MAM. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. Cardiovasc Res. 2010;85(3):413-23.
31. Yeung TK, Simmonds RH, Hopewell JW. A functional assessment of the relative cardiotoxicity of adriamycin and epirubicin in the rat. Radiother Oncol. 1989;15(3):275-84.
32. Hayward R, Hydock DS. Doxorubicin cardiotoxicity in the rat: an in vivo characterization. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2007;46(4):20-32.
33. Robert J. Long-term and short-term models for studying anthracycline cardiotoxicity and protectors. Cardiovasc Toxicol. 2007;7(2):135-9.
34. Andreadou I, Sigala F, Iliodromitis EK, Papaefthimiou M, Sigalas C, Aligiannis N, et al. Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress. J Mol Cell Cardiol. 2007;42(3):549-58.
35. Weinstein DM, Mihm MJ, Bauer JA. Cardiac peroxynitrite formation and left ventricular dysfunction following doxorubicin treatment in mice. J Pharmacol Exp Ther. 2000;294(1):396-401.

36. Danesi R, Fogli S, Gennari A, Conte P, Del Tacca M. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs. Clin Pharmacokinet. 2002;41(6):431-44.
37. Choong CY, Herrmann HC, Weyman AE, Fifer MA. Preload dependence of Doppler-derived indexes of left-ventricular diastolic function in humans. J Am Coll Cardiol. 1987;10(4):800-8.
38. Minicucci MF, Azevedo PS, Oliveira SA, Martinez PF, Chiuso-Minicucci F, Polegato BF, et al. Tissue vitamin A insufficiency results in adverse ventricular remodeling after experimental myocardial infarction. Cell Physiol Biochem. 2010;26(4-5):523-30.
39. Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM. Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolated heart perfusion. J Mol Cel Cardiol. 2011;50(6):940-50.
40. Robert J. Preclinical assessment of anthracycline cardiotoxicity in laboratory animals: predictiveness and pitfalls. Cell Biol Toxicol. 2007;23(1):27-37.
41. Dodd DA, Atkinson JB, Olson RD, Buck S, Cusack BJ, Fleischer S, et al. Doxorubicin cardiomyopathy is associated with a decrease in calcium release channel of the sarcoplasmic reticulum in a chronic rabbit model. J Clin Invest. 1993;91(4):1697-705.
42. Boucek RJ, Jr., Dodd DA, Atkinson JB, Oquist N, Olson RD. Contractile failure in chronic doxorubicin-induced cardiomyopathy. J Mol Cell Cardiol. 1997;29(10):2631-40.
43. Kim SY, Kim SJ, Kim BJ, Rah SY, Chung SM, Im MJ, et al. Doxorubicin-induced reactive oxygen species generation and intracellular Ca2+ increase are reciprocally modulated in rat cardiomyocytes. Exp Mol Med. 2006;38(5):535-45.
44. Mushlin PS, Cusack BJ, Boucek RJ, Jr., Andrejuk T, Li X, Olson RD. Time-related increases in cardiac concentrations of doxorubicinol could interact with

doxorubicin to depress myocardial contractile function. Br J Pharmacol. 1993;110(3):975-82.

45. Lebrecht D, Kirschner J, Geist A, Haberstroh J, Walker UA. Respiratory chain deficiency precedes the disrupted calcium homeostasis in chronic doxorubicin cardiomyopathy. Cardiovasc Pathol. 2010;19(5):e167-74.
46. Swift L, McHowat J, Sarvazyan N. Inhibition of membrane-associated calcium-independent phospholipase A2 as a potential culprit of anthracycline cardiotoxicity. Cancer Res. 2003;63(18):5992-8.
47. Ikeda Y, Hoshijima M, Chien KR. Toward biologically targeted therapy of calcium cycling defects in heart failure. Physiology. 2008;23(1):6-16.
48. Mukherjee S, Banerjee SK, Maulik M, Dinda AK, Talwar KK, Maulik SK. Protection against acute adriamycin-induced cardiotoxicity by garlic: role of endogenous antioxidants and inhibition of TNF-alpha expression. BMC Pharmacol. 2003;3:16.
49. Yi X, Bekeredjian R, DeFilippis NJ, Siddiquee Z, Fernandez E, Shohet RV. Transcriptional analysis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006;290(3):H1098-102.
50. Kandasamy AD, Chow AK, Ali MA, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. Cardiovasc Res. 2010;85(3):413-23.
51. Schulz R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2007;47(1):211-42.

ANEXOS

unesp Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99

Comissão de Ética em Experimentação Animal

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Protocolo n.º **666** sobre o projeto de pesquisa "**Cardiotoxidade aguda induzida por dexorubicina**", a ser conduzido por Natalie Souza e Berha Polegato, orientadas pelo Prof. Dr. Luiz S. Matsubara, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) com a ressalva que os "**ratos**" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de certificar a sanidade dos mesmos.

Projeto de Pesquisa Aprovado em 27 de março de 2008

Prof. Drª Regina Helena G. Martins
Presidente da CEEA

Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEEA