

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 28/02/2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA

Danielle Dantas

**Efeito da inibição da MMP-2 sobre a cardiotoxicidade
induzida pela doxorubicina em ratos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Campus de Botucatu, para defesa de
dissertação de mestrado junto ao programa de pós-
graduação Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Bertha Furlan Polegato

Botucatu
2020

DANIELLE DANTAS

**Efeito da inibição da MMP-2 sobre a cardiotoxicidade
induzida pela doxorrubicina em ratos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Campus de Botucatu, para defesa de
dissertação de mestrado junto ao programa de pós-
graduação Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Bertha Furlan Polegato

**Botucatu
2020**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCN. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTEC. E DOCUMENTAÇÃO - BUNPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTEC. I. RIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE AP. RECIDA VICENTE-e 8/56S1

Dantas, Danielle.

Efeito da inibição da MMP -2 sobre a cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina em ratos / Danielle Dantas. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Bertha Furlan Polegato

Capes: 40101002

1. Cardiotoxicidade. 2. Doxorubicina. 3. Doxíciclina. 4. Rato como animal de laboratório.

Palavras-chave: Cardiotoxicidade; Doxíciclina; Doxorubicina.

“Os resultados da pesquisa não exaltam nem
apaixonam. Mas o esforço tenaz para
compreender e o trabalho intelectual para
receber e para traduzir transformam o homem.”

- Albert Einstein, Como vejo o mundo

Agradecimientos

Especialmente à minha orientadora **Bertha Furlan Polegato**, que é amor e carinho em tudo o que faz. Obrigada por ter confiado em mim e ter me proporcionado essa experiência

À minha família.

Aos meus amigos conquistados nesses dois anos.

Carol Vágula por ter sido meu conforto.

Anny e Ícaro por terem sido família.

Aos meus amigos da vida.

Aos professores do grupo de remodelação cardíaca e nutrição.

Aos colegas de laboratório.

Aos funcionários da unipex, da seção de pós-graduação, da biblioteca e a todos os outros que mantêm a universidade e a pesquisa em andamento.

E por último, mas não menos importante, a CAPES pela bolsa de mestrado e a FAPESP pelo financiamento do projeto.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	HIPÓTESE	14
3	OBJETIVOS	15
3.1	Objetivo geral	15
3.2	Objetivos específicos	15
4	MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1	Delineamento	16
4.2	Ecocardiograma	17
4.3	Estudo do coração isolado	18
4.4	Zimografia para análise da atividade de mmp-2	19
4.5	Western blot	19
4.6	Análise do estresse oxidativo.....	21
4.6.1	Determinação da atividade das enzimas antioxidantes no coração	21
4.6.2	Determinação do dano oxidativo aos lipídios no coração	21
4.7	Avaliação histológica	22
4.8	Análise estatística.....	22
5	RESULTADOS	23
5.1	Evolução ponderal, consumo de ração e peso dos órgãos	23
5.2	Ecocardiograma	25
5.2.1	Variáveis ecocardiográficas estruturais.....	25
5.2.2	Variáveis ecocardiográficas funcionais de diástole	26
5.2.3	Variáveis ecocardiográficas funcionais de sístole	27
5.3	Estudo do coração isolado	28
5.4	Zimografia para análise da atividade de mmp-2	28
5.5	Western blot	29
5.6	Análise do estresse oxidativo.....	30
5.7	Avaliação histológica	30
6	DISCUSSÃO.....	32
7	CONCLUSÃO	38
	REFERÊNCIAS	39

RESUMO

Introdução: a cardiotoxicidade é o efeito adverso mais severo provocado pelo quimioterápico doxorrubicina. As metaloproteinases (MMP) são enzimas proteolíticas que degradam a matriz extracelular e sua ativação é mecanismo importante na dilatação cardíaca provocada pela doxorrubicina. Sua atividade é regulada pelos seus inibidores teciduais específicos (TIMP). A doxiciclina é um inibidor não seletivo de MMP e foi capaz de impedir a remodelação ventricular em outros modelos de agressão cardíaca. Diante disso, investigamos a influência da inibição de MMP sobre a cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina em ratos. **Material e Métodos:** foram utilizados 80 ratos Wistar machos que foram alocados em 4 grupos: controle, doxorrubicina, inibição de MMP e doxorrubicina + inibição de MMP. A inibição das MMP foi realizada por injeção de doxiciclina (5mg/kg, IP) uma vez por semana, por 4 semanas. A doxorrubicina (5mg/kg, IP) foi injetada uma vez por semana, por 4 semanas, sempre 48 horas após a injeção de doxiciclina. Após 4 semanas, foi realizado ecocardiograma, estudo do coração isolado e eutanásia dos animais para coleta do material biológico. Foi realizada análise histológica, avaliação do estresse oxidativo, atividade de MMP-2 e expressão proteica de TIMP-4 e colágeno I por Western blot. Análise estatística: ANOVA de duas vias. **Resultados:** observamos menor ingestão de ração associada à perda de peso dentre os animais que receberam doxorrubicina. O quimioterápico também foi capaz de induzir alterações morfológicas ao ecocardiograma, com aumento do diâmetro do átrio esquerdo e do diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (VE). Em relação à função diastólica, observamos aumento do tempo de relaxamento isovolumétrico do VE, da onda E e relação da relação E/E' nos animais tratados com doxorrubicina. Houve prejuízo também da função sistólica nesses animais, com diminuição da fração de encurtamento do VE e da onda S' ao doppler tissular. A administração do inibidor de MMP associado à doxorrubicina melhorou as variáveis estruturais e a função sistólica ao ecocardiograma. A doxorrubicina causou hipertrofia dos miócitos avaliados pela histologia. Também houve aumento do estresse oxidativo nos animais tratados com o quimioterápico, evidenciado por aumento da concentração miocárdica de malondialdeído, porém a inibição de MMP não influenciou esse resultado. Não houve diferenças no estudo do coração isolado, na atividade de MMP e na expressão de TIMP-4 entre os grupos. No entanto, a administração de doxiciclina diminuiu a expressão de colágeno I tanto nos animais tratados com doxorrubicina quanto nos não tratados. **Conclusão:** A inibição de MMP atenuou a disfunção sistólica do VE causada pela doxorrubicina, porém não foi efetiva em inibir a ativação de MMP, bem como não melhorou o estresse oxidativo. A melhora da disfunção sistólica dos animais tratados com o inibidor da MMP ocorreu por vias ainda a serem elucidadas.

Palavras-chaves: Doxorrubicina. Cardiotoxicidade. MMP. TIMP. Estresse oxidativo. Matriz extracelular.

ABSTRACT

Introduction: Cardiotoxicity is the most severe adverse effect induced by doxorubicin. The matrix metalloproteinases (MMP), which activity is regulated by specific tissue inhibitors (TIMP), are proteolytic enzymes that degrade the extracellular matrix and its activation is an important mechanism in cardiac dilatation observed in cardiotoxicity. The doxycycline is a non-selective inhibitor of MMP and was capable to stop ventricular remodeling in other models of cardiac aggression. Therefore, we investigated the influence of MMP inhibition on induced cardiotoxicity by doxorubicin in rats. **Materials and Methods:** 80 male Wistar rats were classified into 4 groups: control, doxorubicin, MMP inhibition, and doxorubicin + MMP inhibition. The MMP inhibition was made by the injection of doxycycline (5mg/kg, IP) once in a week, for 4 weeks. The doxorubicin (5mg/kg, IP) was injected once a week, for 4 weeks, always 48 hours after the doxycycline injection. After 4 weeks was performed an echocardiogram, isolated heart study, and the euthanasia of the animals to obtain the biological material. We evaluated histological sections, oxidative stress, MMP-2 activity, and TIMP-4, and collagen I protein expression by Western blot. Statistical analysis: two-way ANOVA. **Results:** we observed less chow ingestion associated with weight loss among the animals which received doxorubicin. The chemotherapy was also capable to induce morphological alterations in the echocardiogram, increasing the left atrium diameter and left ventricle systolic diameter (LV). Regarding the diastolic function, was observed an increase in isovolumetric LV relaxation time, E wave, and wave E/E' relationship in animals treated with doxorubicin. These animals also presented worse systolic function, showed by the decrease of the LV shortening fraction and the S' wave obtained by tissue Doppler. The administration of MMP inhibitor associated with doxorubicin improved structural variables and systolic function in the echocardiogram. Also, the doxorubicin caused hypertrophy of the cardiomyocytes evaluated by histology. There was an increase in oxidative stress in animals treated with doxorubicin, as seen by the increased concentration of MDA. There was no difference between groups in the isolated heart study, the MMP-2 activity, and in the TIMP-4 expression. However, doxycycline decreased the expression of type I collagen in all animals treated with doxycycline. **Conclusion:** The inhibition of MMP attenuated the LV systolic function caused by doxorubicin; however, inhibition of MMP was not effective to inhibit the MMP-2 activation, as well did not improve the oxidative stress. The systolic dysfunction improvement in animals treated with MMP inhibitor occurred through pathways to be elucidated yet.

Key-words: Doxorubicin. Cardiotoxicity. MMP. TIMP. Oxidative stress. Extracellular matrix.

1 INTRODUÇÃO

A doxorubicina é um quimioterápico da classe das antraciclinas, extraído do fungo *Streptomyces peucetius*, sendo utilizado no tratamento de diversos tipos de neoplasias com altas taxas de sucesso desde a década de 60 (1). Seu efeito quimioterápico é atribuído, em grande parte, à sua ação junto ao DNA celular, principalmente por inibição da topoisomerase 2 α . Apesar de ser indetectável em tecidos quiescentes, a topoisomerase 2 α encontra-se hiperexpressa no tecido tumoral (2). As antraciclinas se ligam à topoisomerase 2 α impedindo sua ação de ajuste da dupla hélice de DNA durante a replicação e transcrição que, em última instância, provoca a morte da célula neoplásica (3, 4).

A despeito da sua efetividade no tratamento do câncer, apresenta diversos efeitos colaterais, como alopecia, neutropenia, neuropatia, náuseas e vômitos. Entretanto, seu efeito colateral mais grave é a cardiotoxicidade. Essa complicação pode ocorrer em 5 a 26% dos pacientes tratados com a medicação, a depender da dose total utilizada, sendo que, atualmente, o limite de dose para uso clínico da doxorubicina é de 450 mg/m² de superfície corporal (4).

A cardiotoxicidade pode ser dividida, clinicamente, em aguda, subaguda, crônica e tardia, a depender do tempo decorrido da administração da doxorubicina e o aparecimento dos sintomas. A forma clínica mais comum é a crônica, que surge semanas a meses após o uso da droga e tem a manifestação clínica mais exuberante da cardiotoxicidade, que é a insuficiência cardíaca decorrente de miocardiopatia dilatada (5). A presença de insuficiência cardíaca confere ao paciente um prognóstico muito reservado e, mesmo quando o paciente não morre em decorrência da insuficiência cardíaca, este tem uma qualidade de vida muito ruim e importante limitação das atividades habituais da vida diária devido ao quadro instalado de insuficiência cardíaca.

Mesmo a cardiotoxicidade sendo conhecida desde o início do uso da droga, ainda não dispomos de bons métodos de rastreio e detecção precoce e que tenham sensibilidade e especificidade adequadas (4). Apesar de alguns tratamentos terem se mostrado efetivos em reduzir a mortalidade na insuficiência cardíaca com fração de ejeção reduzida, como é o caso da cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina, essa redução na mortalidade não ocorre de maneira expressiva (3, 4), o que sugere que o ideal seria identificar estratégias que prevenissem o surgimento da

cardiotoxicidade. Para isso, é essencial entendermos a fisiopatologia dessa manifestação.

Os mecanismos envolvidos no surgimento da cardiotoxicidade são múltiplos, mas, tradicionalmente, é atribuído ao estresse oxidativo papel central na sua fisiopatologia. O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a formação e a remoção de agentes oxidantes no organismo, sendo que o acúmulo de espécies reativas, seja de nitrogênio ou oxigênio, é um dos principais fatores que contribui com esse desequilíbrio. Também pode contribuir para esse desequilíbrio a diminuição da atividade das enzimas antioxidantes. Agudamente, a administração de doxorubicina diminui a atividade da glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase (6).

A doxorubicina é capaz de gerar espécies reativas por diversas vias. Uma dessas vias está associada à lesão e disfunção mitocondrial, com diminuição da atividade dos complexos enzimáticos (6, 7) que leva à interrupção da cadeia transportadora de elétrons e consequente acúmulo de elétrons desemparelhados, aumentando a formação de espécies reativas de oxigênio e diminuição da produção de ATP (8,9). Outra fonte de geração de espécies reativas de oxigênio é mediada pela interação direta da doxorubicina com o ferro e também pela redução intracelular das proteínas reguladoras desse metal, perpetuando, assim, a fonte de geração de espécies reativas (8). Uma terceira via de geração de espécies reativas é a partir da ligação da doxorubicina com o domínio redutase da óxido nítrico sintase, que culmina com a formação de espécies reativas de nitrogênio (9).

Mais recentemente, Zhang e colaboradores identificaram que o mecanismo primordial da cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina é sua atuação junto à topoisomerase 2 β . Diferentemente da topoisomerase 2 α já citada, a topoisomerase 2 β é expressa em cardiomiócitos normais de mamíferos, sendo que a doxorubicina é capaz de inibir tanto a topoisomerase 2 α quanto a topoisomerase 2 β . Nesse estudo, animais com deleção do gene que codifica a topoisomerase 2 β não apresentaram aumento do estresse oxidativo, lesão e disfunção mitocondrial ou disfunção cardíaca, ao passo que os animais que expressavam normalmente a topoisomerase 2 β apresentaram todas essas alterações. Isso nos leva a crer que o aumento do estresse oxidativo, as alterações mitocondriais e a disfunção cardíaca observada após a infusão do quimioterápico são secundários às alterações no transcriptoma e não da ação direta da doxorubicina no equilíbrio redox, como se acreditava anteriormente (2).

Independentemente da origem do estresse oxidativo, é sabido que seu aumento leva à ativação de metaloproteinases de matriz (MMP). As MMP são uma família composta por mais de 25 enzimas proteolíticas zinco-dependentes, sendo que as MMP mais abundantes no miocárdio são as MMP-2 e MMP-9, também conhecidas como gelatinases. São produzidas na sua forma inativa por diversos tipos celulares presentes no miocárdio como cardiomiócitos, fibroblastos, células endoteliais e macrófagos. São exportadas para o exterior das células, onde se ligam a componentes específicos da matriz extracelular, mas ainda em suas formas quiescentes (10).

Para que haja ativação das MMP é necessário que ocorra quebra do seu peptídeo terminal, que expõe o sítio catalítico das mesmas e permite que atuem na degradação dos componentes da matriz extracelular. A ativação das MMP é um processo fisiológico e é importante para a manutenção normal dos tecidos, principalmente aqueles com altas taxas de “turnover”. No entanto, a excessiva ativação das MMP pode ocorrer secundariamente a diversos estímulos patológicos, como sobrecargas pressóricas e volumétricas, estímulos hormonais, inflamatórios e aumento do estresse oxidativo (11).

A atividade das MMP é regulada e limitada pela presença de seu inibidor tecidual específico, denominado TIMP. Existem quatro tipos de TIMP que tem ação sobre diversos tipos de MMP, mas a forma mais abundante no coração parece ser o TIMP-4. Esse inibidor tem efeito inibitório tanto sobre MMP-2 quanto MMP-9 (10). A inibição da atividade das MMP se dá pela ligação do TIMP ao sítio ativo das enzimas, no entanto, os TIMP podem desempenhar outras funções teciduais além da inibição das MMP, como estimular hipertrofia tecidual e participar da apoptose (11).

Adicionalmente, interessantes estudos têm mostrado que as MMP podem ser parcialmente ativadas mesmo fora de seu sítio principal de atuação, que é a matriz extracelular. Quando ativadas no interior da célula, tem como alvo de ação proteínas do aparelho contrátil do cardiomiócito, o que poderia contribuir para um déficit de contratilidade do ventrículo esquerdo (12). O principal determinante para essa ativação intracelular é o aumento do estresse oxidativo (13).

As MMP parecem ter papel fundamental na remodelação cardíaca em diversas situações patológicas, como hipertensão arterial sistêmica e infarto agudo do miocárdio. A dilatação ventricular que acompanha o processo de remodelação acontece em decorrência do rearranjo dos miócitos em paralelo e para que isso

ocorra é importante que as proteínas estruturais da matriz que sustentam os miócitos sejam degradadas (11). Há forte evidência científica que os aumentos da expressão e da atividade das MMP estão envolvidos na cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina e que a ativação de MMP-2 é evento precoce na cardiotoxicidade (6, 14-16). O uso de diversas drogas e substâncias, como tetrametilpirazina (17), curcumina (18) e quercetina (19), já se mostram efetivas em inibir MMP, inclusive no modelo de cardiotoxicidade (20-22). No entanto, não é possível estabelecer uma relação direta entre a diminuição da atividade de MMP observada nesses estudos e a atenuação da cardiotoxicidade, pois essas substâncias atuam em outras vias envolvidas no dano miocárdico.

Por outro lado, a inibição específica, mas não seletiva, das MMP com doxiciclina foi capaz de impedir a remodelação ventricular após infarto do miocárdio, em situações de sobrecarga de volume (11, 23), e também prevenir o dano cardíaco induzido por hipóxia neonatal (24), o que nos leva a crer a inibição direta das MMP poderia constituir um importante alvo terapêutico na prevenção da cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina.

2 CONCLUSÃO

A doxorubicina induziu aumento de estresse oxidativo, acompanhado de alterações estruturais e funcionais cardíacas que caracterizam a cardiotoxicidade. Apesar de não modificar a atividade da MMP-2 neste modelo crônico, o uso do inibidor de MMP foi capaz de atenuar as alterações estruturais e funcionais induzidas pela doxorubicina por vias ainda a serem elucidadas.

REFERÊNCIAS

1. Volkova M, Russell R 3rd. Anthracycline cardiotoxicity: prevalence, pathogenesis and treatment. *Curr Cardiol Rev*. 2011;7:214-20.
2. Zhang S, Liu X, Bawa-Khalfe T, Lu LS, Lyu YL, Liu LF, Yeh ET. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med*. 2012;18:1639-42.
3. Sawyer DB. Anthracyclines and heart failure. *N Engl J Med*. 2013;368:1154-6.
4. Vejpongsa P, Yeh ET. Prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity: challenges and opportunities. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64:938-45.
5. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*. 2004; 56:185-229.
6. Carvalho PB, Gonçalves AF, Alegre PH, Azevedo PS, Roscani MG, Bergamasco CM, et al. Pamidronate Attenuates Oxidative Stress and Energetic Metabolism Changes but Worsens Functional Outcomes in Acute Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Rats. *Cell Physiol Biochem*. 2016;40:431-42.
7. Carvalho FS, Burgeiro A, Garcia R, Moreno AJ, Carvalho RA, Oliveira PJ. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: from bioenergetic failure and cell death to cardiomyopathy. *Med Res Rev*. 2014; 34:106-35.
8. Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, Janssens S, Crijns HJ, Moens AL. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;52:1213-25.
9. Ghigo A, Li M, Hirsch E. New signal transduction paradigms in anthracycline-induced cardiotoxicity. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863:1916-25.
10. Johansson N, Ahonen M, Kähäri VM. Matrix metalloproteinases in tumor invasion. *Cell Mol Life Sci*. 2000;57:5-15.
11. Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev*. 2007; 87:1285-342.
12. Schulz R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007;47:211-42.
13. Kandasamy AD, Chow AK, Ali MA, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. *Cardiovasc Res*. 2010;85:413-23.
14. Polegato BF, Minicucci MF, Azevedo PS, Carvalho RF, Chiuso-Minicucci F, Pereira EJ, et al. Acute doxorubicin-induced cardiotoxicity is associated with matrix metalloproteinase-2 alterations in rats. *Cell Physiol Biochem*. 2015;35:1924-33.
15. 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; 53:341-6.

16. Bai P, Mabley JG, Liaudet L, Virag L, Szabo C, Pacher P. Matrix metalloproteinase activation is an early event in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Oncol Rep.* 2004; 11:505-8.
17. Yang B, Li H, Qiao Y, Zhou Q, Chen S, Yin D, He H, et al. Tetramethylpyrazine Attenuates the Endotheliotoxicity and the Mitochondrial Dysfunction by Doxorubicin via 14-3-3 γ /Bcl-2. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;3;2019:5820415.
18. He H, Luo Y, Qiao Y, Zhang Z, Yin D, Yao J, et al. Curcumin attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity via suppressing oxidative stress and preventing mitochondrial dysfunction mediated by 14-3-3 γ . *Food Funct.* 2018;9:4404-418.
19. Chen X, Peng X, Luo Y, You J, Yin D, Xu Q, et al. Quercetin protects cardiomyocytes against doxorubicin-induced toxicity by suppressing oxidative stress and improving mitochondrial function via 14-3-3 γ . *Toxicol Mech Methods.* 2019;29:344-54
20. Tocchetti CG, Carpi A, Coppola C, Quintavalle C, Rea D, Campesan M, et al. Ranolazine protects from doxorubicin-induced oxidative stress and cardiac dysfunction. *Eur J Heart Fail.* 2014;16:358-66.
21. Chen X, Guo Z, Wang P, Xu M. Erythropoietin modulates imbalance of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Heart Lung Circ.* 2014;23:772-7.
22. Arozal W, Watanabe K, Veeraveedu PT, Thandavarayan RA, Harima M, Sukumaran V, et al. Effect of telmisartan in limiting the cardiotoxic effect of daunorubicin in rats. *J Pharm Pharmacol.* 2010;62:1776-83.
23. Cerisano G, Buonamici P, Gori AM, Valenti R, Sciagrà R, Giusti B, et al. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor after reperfused ST-elevation myocardial infarction treated with doxycycline. Insights from the TIPTOP trial. *Int J Cardiol.* 2015; 197:147-53.
24. LaBossiere JR, Pelletier JS, Ali MA, Thiesen A, Schulz R, Bigam DL, Cheung PY. Postresuscitation administration of doxycycline preserves cardiac contractile function in hypoxia-reoxygenation injury of newborn piglets. *Crit Care Med.* 2014;42:e260-9.
25. Henriksen PA. Anthracycline cardiotoxicity: an update on mechanisms, monitoring and prevention. *Heart.* 2018;104:971-7.
26. Tanai E, Frantz S. Pathophysiology of Heart Failure. *Compr. Physiol.* 2015;6:187-214.
27. Li X, Gu J, Zhang Y, Feng S, Huang X, Jiang Y et al. L-arginine alleviates doxorubicin-induced endothelium-dependent dysfunction by promoting nitric oxide generation and inhibiting apoptosis. *Toxicology.* 2019;423:105-11.
28. Gauri Akolkar, Navdeep Bhullar, Hilary Bews, Bilal Shaikh, Sheena Premecz, Kimberly-Ann Bordun. The role of renin angiotensin system antagonists in the prevention of doxorubicin and trastuzumab induced cardiotoxicity. *Cardiovasc Ultrasound.* 2015;13:18.
29. Y. C. de Vries, M. M. G. A. van den Berg, J. H. M. de Vries, S. Boesveldt, J. Th. C. M. de Kruif, N. Buist, A. Haringhuizen, et al. Differences in dietary intake during chemotherapy in

breast cancer patients compared to women without cancer. *Support Care Cancer*. 2017;25:2581–91.

30. Fabrizio Pin, Marion E. Couch, Andrea Bonetto. Preservation of muscle mass as a strategy to reduce the toxic effects of cancer chemotherapy on body composition. *Curr Opin Support Palliat Care*. 2018;12:420–6.

31. Albert Z. Luu, Biswajit Chowdhury, Mohammed Al-Omran, Hwee Teoh, David A. Hess, Subodh Verma. Role of Endothelium in Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. *JACC Basic Transl Sci*. 2018; 3:861–70.

32. Moritz Schnelle, Norman Catibog, Zhang Min, Adam A. Nabeebaccus, Benevolência Anderson, Daniel A. Richards, et al. Echocardiographic evaluation of diastolic function in mouse models of heart disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2018;114:20–28.

33. Ito T, Suwa M. Echocardiographic tissue imaging evaluation of myocardial characteristics and function in cardiomyopathies. *Heart Fail Rev*. 2020;16.

34. Banerjee D, Chaudhuri RD, Niyogi S, Chowdhuri SR, Sarkar MP, Chatterjee R, et al. Metabolic impairment in response to early induction of C/EBP β leads to compromised cardiac function during pathological hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*. 2020;139:148-63.

35. Rodrigues JC, Rohan S, Dastidar AG, Trickey A, Szantho G, Ratcliffe LE, et al. The Relationship Between Left Ventricular Wall Thickness, Myocardial Shortening, and Ejection Fraction in Hypertensive Heart Disease: Insights From Cardiac Magnetic Resonance Imaging. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2016;18:1119-27.

36. Gaignebet L, Kańduła MM, Lehmann D, Knosalla C, Kreil DP, Kararigas G. Sex-Specific Human Cardiomyocyte Gene Regulation in Left Ventricular Pressure Overload. *Mayo Clin Proc*. 2020;19:31082-1.

37. B. Song, BN Wang, DN Chen, ZG Luo. Myocardial remodeling and bioelectric changes in tachycardia-induced heart failure in dogs. *Braz J Med Biol Res*. 2013;9:797–802.

38. Wolf CM. Hypertrophic cardiomyopathy: genetics and clinical perspectives. *Cardiovasc Diagn Ther*. 2019;9:S388-S415.

39. Marian AJ, Braunwald E. Hypertrophic Cardiomyopathy: Genetics, Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Therapy. *Circ Res*. 2017;121:749-70.

40. Sylvie Ricard-Blum. The Collagen Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3:a004978.

41. Dong Fan, Abhijit Takawale, Jiwon Lee, Zamaneh Kassiri. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012;5:15.

42. Samartzis EP, Fink D, Stucki M, Imesch P. Doxycycline reduces MMP-2 activity and inhibits invasion of 12Z epithelial endometriotic cells as well as MMP-2 and -9 activity in primary endometriotic stromal cells in vitro. *Reprod Biol Endocrinol*. 2019;17:38.

43. Saeed M, Arun MZ, Guzeloglu M, Onursal C, Gokce G, Korkmaz CG, et al. Low-dose doxycycline inhibits hydrogen peroxide-induced oxidative stress, MMP-2 up-regulation and contractile dysfunction in human saphenous vein grafts. *Drug Des Devel Ther.* 2019;13:1791-801.
44. Sabir N, Hussain T, Mangi MH, Zhao D, Zhou X. Matrix metalloproteinases: Expression, regulation and role in the immunopathology of tuberculosis. *Cell Prolif.* 2019;52:e12649.
45. Zhang F, Hu L, Wu YX, Fan L, Liu WT, Wang J, et al. Doxycycline alleviates paraquat-induced acute lung injury by inhibiting neutrophil-derived matrix metalloproteinase 9. *Int Immunopharmacol.* 2019;72:243-51.
46. Xi Wang, Raouf A. Khalil. Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease. *Adv Pharmacol.* 2018;81:241–330.
47. Owolabi US, Amraotkar AR, Coulter AR, Singam NSV, Aladili BN, Singh A, et al. Change in matrix metalloproteinase 2, 3, and 9 levels at the time of and after acute atherothrombotic myocardial infarction. *J Thromb Thrombolysis.* 2020;2:235-244.
48. Chan BYH, Roczkowsky A, Moser N, Poirier M, Hughes BG, Ilaraza R, et al. Doxorubicin induces de novo expression of N-terminal-truncated matrix metalloproteinase-2 in cardiac myocytes. *Can J Physiol Pharmacol.* 2018;12:1238-1245.
49. Keyvan Karimi Galougahi, Charalambos Antoniadis, Stephen J. Nicholls, Keith M. Channon, Gemma A. Figtree. Redox biomarkers in cardiovascular medicine. *European Heart Journal.* 2015;36:1576–82.
50. Kaviyarasi Renu; Abilash V.G.; Tirupathi Pichiah P.B.; Sankarganesh Arunachalam. Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy – An update. *Eur J Pharmacol.* 2018;818:241-53.
51. van der Pol A, van Gilst WH, Voors AA, van der Meer P. Treating oxidative stress in heart failure: past, present and future. *Eur J Heart Fail.* 2019;21:425-35.
52. Tomin T, Schittmayer M, Honeder S, Heininger C, Birner-Gruenberger R. Irreversible oxidative post-translational modifications in heart disease. *Expert Rev Proteomics.* 2019;30:1-13.
53. Carvalho PB, Gonçalves AF, Alegre PH, Azevedo PS, Roscani MG, Bergamasco CM, et al. Pamidronate Attenuates Oxidative Stress and Energetic Metabolism Changes but Worsens Functional Outcomes in Acute Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Rats. *Cell Physiol Biochem.* 2016;40:431-442.
54. Mathias LMBS, Alegre PHC, Santos IOF, Bachiega T, Figueiredo AM, Chiuso-Minicucci F, et al. Euterpe oleracea Mart. (Açaí) Supplementation Attenuates Acute Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Rats. *Cell Physiol Biochem.* 2019;2:388-399.

55. Ghigo A, Li M, Hirsch E. New signal transduction paradigms in anthracycline-induced cardiotoxicity. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863:1916-25.
56. Dolinsky VW, Cole LK, Sparagna GC, Hatch GM. Cardiac mitochondrial energy metabolism in heart failure: Role of cardiolipin and sirtuins. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1861:1544-54.
57. Baikuntha Aryal, Ashutosh Rao. Deficiency in Cardiolipin Reduces Doxorubicin-Induced Oxidative Stress and Mitochondrial Damage in Human B-Lymphocytes. *PLoS One*. 2016;7:e0158376.
58. Manning MW, Cassis LA, Daugherty A. Differential effects of doxycycline, a broad-spectrum matrix metalloproteinase inhibitor, on angiotensin II-induced atherosclerosis and abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;1;23:483-8
59. Jae-Joon Jung, Mahmoud Razavian, Hye-Yeong Kim, Yunpeng Ye, Reza Golestani, Jakub Toczek, et al. Matrix metalloproteinase inhibitor, doxycycline and progression of calcific aortic valve disease in hyperlipidemic mice. *Sci Rep*. 2016;6:32659.
60. Xie X, Lu H, Moorleggen JJ, Howatt DA, Rateri DL, Cassis LA, et al. Doxycycline does not influence established abdominal aortic aneurysms in angiotensin II-infused mice. *PLoS One*. 2012;7:e46411.
61. Arpino V , Brock M , Gill SE. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biol*. 2015;44-46:247-54.
62. Michael O. Griffin, Guillermo Ceballos, Francisco Villarreal. Tetracycline compounds with non-antimicrobial organ protective properties: possible mechanisms of action. *Pharmacol Res*. 2011;63:102–7.