

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
POS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

EFEITOS CARDIOVASCULARES DA ASSOCIAÇÃO DO HORMÔNIO
TIREOIDIANO E DO TREINAMENTO FÍSICO NA CARDIOTOXICIDADE
INDUZIDA POR DOXORRUBICINA EM RATOS.

Fernanda Rodrigues de Souza

Uberlândia
2017

Fernanda Rodrigues de Souza

EFEITOS CARDIOVASCULARES DA ASSOCIAÇÃO DO HORMÔNIO
TIREOIDIANO E DO TREINAMENTO FÍSICO NA CARDIOTOXICIDADE
INDUZIDA POR DOXORRUBICINA EM RATOS.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Elmiro Santos Resende.

Co-orientadora: Prof^a Dra Erica Carolina Campos Pulici

Uberlândia

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S729e
2017 Souza, Fernanda Rodrigues de, 1981
Efeitos cardiovasculares da associação do hormônio tireoidiano e do
treinamento físico na cardiotoxicidade induzida por doxorubicina em
ratos / Fernanda Rodrigues de Souza. - 2017.
81 p. : il.

Orientador: Elmiro Santos Resende.
Coorientadora: Érica Carolina Campos Pulici.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2017.9>
Inclui bibliografia.

1. Ciências médicas - Teses. 2. Hormônios Tireóideos - Teses. 3.
Antraciclina - Teses. 4. Exercícios físicos - Teses. I. Resende, Elmiro
Santos. II. Pulici, Érica Carolina Campos. III. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV.
Título.

CDU: 61

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fernanda Rodrigues de Souza

EFEITOS CARDIOVASCULARES DA ASSOCIAÇÃO DO HORMÔNIO TIREOIDIANO E DO TREINAMENTO FÍSICO NA CARDIOTOXICIDADE INDUZIDA POR DOXORRUBICINA EM RATOS.

Presidente da banca (orientador): Prof. Dr. Elmiro Santos Resende

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.
Área de concentração: Ciências da Saúde.

Banca Examinadora

Titular: Profa. Dra. Mara Rúbia Nunes Celes
Instituição: Universidade Federal de Goiás – IPTSP

Titular: Prof. Dr. Marcus Vinicius Simões
Universidade de São Paulo - USP

Titular: Prof. Dr. Aguinaldo Coelho da Silva
Instituição: Universidade Federal de Uberlândia - UFU

Titular: Prof. Dra. Maria Luiza Mendonça Pereira Jorge
Instituição: Universidade Federal de Uberlândia - UFU

Dedicatória

À Deus, minha família, meus amigos e colegas de trabalho, ao meu orientador pelo apoio, força, incentivo, companherismo e amizade. Sem eles nada disso seria possível.

Agradecimentos

A Deus, que é minha força e minha fortaleza.

A minha mãe, meus avós, meu irmão e meu filho pelo amor e dedicação. Agradeço em especial a vocês que me apoiaram e apostaram em mim, mais que ninguém e que certamente, são os que mais vibram e compartilham de minha alegria.

A meu marido, pelo apoio, dedicação, ajuda e principalmente sua paciência.

Aos meus amigos, por deixar a vida mais alegre e mais colorida. É bom saber que tenho amigos nos quais posso confiar, que me apoiaram e acolhem com tanto carinho.

A minha co-orientadora. Resumi-la a minha co-orientadora é muito pouco e tenho certeza de que ela sente a importância que teve e tem para mim não só na condução do trabalho, mas também como conselheira.

Ao meu orientador, pela paciência e pelos conhecimentos compartilhados. Pela amizade e pela confiança na minha capacidade que transformou meu sonho em realidade. Obrigada pela fundamental contribuição no meu caminhar e crescimento enquanto pessoa e pesquisadora.

Aos meus colegas do doutorado e do grupo de estudo CARDIOEX a convivência com pessoas tão diferentes, certamente contribuiu para meu amadurecimento pessoal, profissional e científico. Obrigada pelos momentos de entusiasmo compartilhados em conjunto.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – UFU, pela excelência e organização.

As secretárias da Pós-graduação Gisele e Viviane pela disponibilidade e auxílio competente durante esses anos de estudo.

A equipe do CEBEA pelo apoio, carinho nessa etapa da minha vida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de doutorado, garantindo tempo protegido para a realização desse projeto.

A todos aqueles que direta ou indiretamente estiveram presentes na realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Resumo

Introdução: A doxorrubicina (DOX) é um agente quimioterápico que, além de suas propriedades antineoplásicas, também pode causar efeitos tóxicos sobre o coração evoluindo, muitas vezes, para a insuficiência cardíaca (IC). Os hormônios tireoidianos possuem papel importante no crescimento, desenvolvimento e metabolismo do organismo. Um alvo da ação desses hormônios é o tecido cardíaco onde eles exercem grande número de influências promovendo alterações estruturais, funcionais e moleculares. Outra abordagem que traz benefícios ao tratamento da IC é o exercício físico, o qual provoca inúmeras adaptações morfofuncionais que ocorrem tanto a nível central como periférico. Não há, no presente momento e no limite do nosso conhecimento, estudos referentes à utilização do exercício físico após o emprego da DOX e nem quanto à possibilidade de emprego de hormônio tireoidiano nesta situação clínica.

Objetivo: Analisar os efeitos do hormônio tireoidiano e do treinamento físico na cardiotoxicidade induzida por DOX, através da avaliação da resposta da tolerância ao esforço físico, das alterações estruturais do miocárdio e da função cardíaca.

Materiais e Métodos: Foram utilizados 60 ratos da linhagem Wistar, machos, adultos, divididos aleatoriamente em sete grupos: controle (C), exercício (EX), hormônio tireoidiano (HT), doxorrubicina (DX), doxorrubicina e exercício (DXEX), doxorrubicina e hormônio (DXHT) e doxorrubicina, exercício e hormônio (DXEXHT). Os animais dos grupos DX, DXEX, DXHT e DXEXHT receberam injeções intraperitoneais de cloridrato de doxorrubicina, três vezes por semana, ao longo de duas semanas, atingindo a dose cumulativa de 7,5mg/kg. Após duas semanas do término do período de administração de DOX, os grupos DXHT e DXEXHT receberam hormônio tireoidiano (T4) diariamente, durante quatro semanas, por meio de sondagem orogástrica. A dose administrada foi de 10µg/100g de peso corporal. Também, após duas semanas da administração de DOX, os grupos DXEX e DXEXHT iniciaram o protocolo de exercício físico. O exercício utilizado foi a natação com os animais suportando carga adicional correspondente a 5% do peso corporal. O treinamento foi conduzido durante 4 semanas, com três sessões semanais de natação. O grupo HT recebeu apenas hormônio e o grupo EX participou apenas do protocolo de treinamento físico. Quarenta e oito horas após a última sessão de treinamento, os animais de todos os grupos foram submetidos a um teste exaustivo de natação, que consistia em nadar até a exaustão, com a sobrecarga de 5% do peso corporal fixado ao corpo. Após o teste de tolerância, foram realizados o ecocardiograma, sendo os animais sacrificados para obtenção do material necessário ao estudo anátomo-patológico do coração por microscopia óptica convencional. Os valores do teste de tolerância, frequência cardíaca, fração de ejeção e fração de encurtamento foram comparados entre as categorias com Modelos Lineares Generalizados, adotando-se significância de 5%.

Resultados: A tolerância ao esforço (TE) no grupo EX foi maior quando comparada aos demais grupos experimentais. O grupo DXEX apresentou melhor TE quando comparado ao grupo DX. O hormônio tireoidiano ministrado após DOX aumentou a TE, mas de forma menos eficaz do que o exercício físico. O protocolo de exercício físico utilizado após o uso de DOX aumentou a TE e a associação com hormônio tireoidiano não potencializou este efeito. A associação também não piorou o desempenho físico dos animais. Foram observadas células miocárdicas aumentadas em tamanho sem infiltrado de células inflamatórias no grupo DXEX. A fração de ejeção do grupo DX foi mais baixa em comparação ao grupo C, EX e DXEX.

Conclusão: O treinamento com exercício físico regular e de baixa intensidade e o hormônio tireoidiano após o uso de DOX melhoraram a tolerância ao esforço dos animais e o exercício físico preservou a estrutura e a função cardíacas de ratos após tratamento com DOX.

Palavras-chave: Antraciclinas. Exercício físico. Levotiroxina sódica. Cardioproteção.

Abstract

Introduction: Doxorubicin (DOX) is a chemotherapeutic agent that, in addition to its antineoplastic properties, can also cause toxic effects on the heart with consequent heart failure. Thyroid hormones play an important role in the growth, development, and metabolism of the body. A target for the action of these hormones is cardiac tissue where they exert a large number of influences promoting structural, functional and molecular changes. Another approach that brings benefits to the treatment of HF is physical exercise, which causes innumerable morphofunctional adaptations that occur at both the central and peripheral levels. There are, to the best of our knowledge, no studies concerning the use of physical exercise after the use of DOX and the possibility of using thyroid hormone in this clinical situation.

Objective: This study aimed to analyze the effects of thyroid hormone and physical training on DOX-induced cardiotoxicity by assessing the tolerance response to physical effort, structural changes in the myocardium and cardiac function.

Materials and methods: Sixty male Wistar rats were randomly allocated to seven groups: control (C), exercise (EX), thyroid hormone (TH), doxorubicin (DX), doxorubicin and exercise (DXEX), doxorubicin and hormone (DXTH) and doxorubicin + exercise and hormone (DXEXTH). The animals from DX, DXEX, DXTH e DXEXTH groups received intraperitoneal injections of doxorubicin hydrochloride, three times a week, for two weeks, reaching a cumulative dose of 7.5mg/kg. After two weeks of the ending the infusion of DOX, the groups TH, DXTH and DXEXTH began to receive daily thyroid hormone, for four weeks, by orogastric probe, at a dose of 10µg/100g of body weight. Also, after two weeks of DOX administration, the groups EX, DXEX e DXEXTH performed exercise using swimming for four weeks with three weekly sessions. The exercise was performed using a loading up to 5% of body weight. The training was conducted during 4 weeks with three weekly swimming sessions. Forty-eight hours after the last training session, animals from all groups underwent a thorough swimming test, which consisted of swimming to exhaustion, with an overload of 5% of body weight fixed to the body. After the tolerance test, echocardiography was performed and fragments of left ventricle was obtained and processed to conventional light microscopy. Tolerance test, heart rate, ejection fraction and shortening fraction values were compared between the categories with Generalized Linear Models, with a significance of 5%.

Results: The exercise tolerance (ET) in the EX group was higher when compared to the other experimental groups. The DXEX group presented better ET when compared to the DX group. Thyroid hormone given after DOX increased ET but less effectively than exercise. The exercise protocol used after the use of DOX increased ET and the association with thyroid hormone did not potentiate this effect. The association also did not worsen the physical performance of the animals. Increased myocardial cells were observed in size without infiltrating inflammatory cells in the DXEX group. The behavior of the ejection fraction of the DX group presented lower value in comparison to group C, EX and DXEX.

Conclusion: We concluded that training with regular and low intensity exercise and thyroid hormone after use of DOX improved the effort tolerance of the animals and preserved the cardiac structure and function of rats after DOX treatment.

Key words: Anthracyclines. Exercise. Thyroxine. Cardioprotection.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHA	American Heart Association
ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	Adenosinatrifosfatases
C	Grupo Controle
Ca ⁺⁺	Cálcio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
DIVEd	Diâmetro do ventrículo esquerdo na diástole
DIVEs	Diâmetro do ventrículo esquerdo na sístole
DX	Grupo Doxorrubicina
DXEX	Grupo Doxorrubicina e exercício
DXEXHT	Grupo Doxorrubicina e hormônio tireoidiano e exercício físico
DXHT	Grupo Doxorrubicina e hormônio tireoidiano
EX	Grupo Exercício
FEVE	Fração de ejeção do ventrículo esquerdo
FS	Fração de encurtamento
HC	Hipertrofia cardíaca
HT	Grupo Hormônio Tireoidiano
IC	Insuficiência cardíaca
ICC	Insuficiência cardíaca crônica
K ⁺	Potássio
MHC	Cadeia pesada de miosina
Mhz	Mega-Hertz
MMP-1	Metaloproteinase 1
Na ⁺	Sódio
NaCL	Cloreto de sódio
PLC	Fosfolambam
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SERCA	Proteína do retículo sarcoplasmático Ca ²⁺ ATPase
TE	Tolerância ao esforço
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TRE	Elementos responsivos aos hormônios
T3	Triiodotironina
T4	Tetraiodotironina
VVEd	Volume diastólico do ventrículo esquerdo
VVEs	Volume sistólico do ventrículo esquerdo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Doxorrubicina	11
1.2 Insuficiência cardíaca	14
1.3 Hormônio tireoidiano	17
1.3.1 Ações diretas e indiretas do hormônio tireoidiano	18
1.4 Exercício físico	19
2 HIPÓTESES	21
3 OBJETIVO	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS	22
5 RESULTADOS	28
5.1 Artigo 1	29
5.2 Artigo 2	47
REFERENCIA	62
APÊNDICE A - Publicação	66
ANEXO A - Carta do comitê de ética	77
ANEXO B – Passo a passo da preparação histológica	78

1- INTRODUÇÃO

A doxorrubicina (DOX) é um agente quimioterápico que, além de suas propriedades antineoplásicas, também causa efeitos tóxicos sobre o coração podendo produzir insuficiência cardíaca com consequente intolerância aos esforços. Para minimizar esta complicação terapêutica tem sido preconizado o emprego do exercício físico previamente à administração de DOX. Não há, no limite do nosso conhecimento, estudos referentes à utilização do exercício físico após o emprego da DOX e nem quanto à possibilidade de emprego de hormônio tireoidiano nesta situação clínica.

Doxorrubina

A doxorrubicina é um dos mais importantes agentes antitumorais (CHATTERJEE, K. et al, 2010), sendo utilizada desde a década de 60 na prática clínica (SIVESKI-ILISKOVIC, N. et al, 1995) e desempenha importante papel no tratamento de neoplasias humanas, incluindo nelas uma grande variedade de tumores sólidos e hematopoiéticos (ILISKOVIC, N. et al.1999).

A doxorrubicina é um antibiótico glicosídico, pertencente ao grupo das antraciclina, produzido pelo fungo *Streptomyces peucetius*, var. *caesius*, e pode ser sintetizado quimicamente a partir da daunorrubicina. A molécula de doxorrubicina contém um aminossacarídeo, a daunosamina, ligado por meio de uma ponte glicosídica ao núcleo da droga, denominado adriamicinona. Todos os agentes citotóxicos da classe das antraciclina possuem moléculas quinona e hidroquinona nos anéis adjacentes, respectivamente anéis B e C, que lhes permitem funcionar como doadores e receptores de elétrons (SINGAL, P. et al, 2000). A farmacocinética da doxorrubicina caracteriza-se por substancial ligação da droga a proteínas e aos tecidos, sendo as concentrações teciduais muito maiores que os níveis plasmáticos. A maior parte da droga nos tecidos localiza-se no núcleo das células e, em menor quantidade, nas mitocôndrias (TALLARICO, D. et al, 2003).

O entusiasmo inicial à descoberta desses agentes antitumorais foi abalado quando se tornaram óbvios seus graves efeitos colaterais: as antraciclina, principalmente a doxorrubicina, podem ser tóxicas a outros órgãos pelo seu efeito cumulativo. O principal fator limitante do uso desses agentes antineoplásicos é a cardiotoxicidade dose-dependente com o desenvolvimento de cardiomiopatia e

insuficiência cardíaca (SINGAL, P. et al, 2000; STEINHERZ, J. et al, 1991). A Diretriz Brasileira de Cardio-Oncologia recomenda que a dose cumulativa de doxorubicina não ultrapasse 450-500 mg/m² (KALIL FILHO, R. et al, 2011).

O mecanismo dos efeitos terapêuticos da doxorubicina nas células tumorais é diferente dos mecanismos da sua cardiotoxicidade. Os efeitos antitumorais incluem à sua intercalação no ácido desoxirribonucleico (DNA), levando à inibição da biossíntese de macromoléculas, à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e danos irreversíveis ao DNA por inibição da topoisomerase II (ANJOS FERREIRA, A.L. et al, 2007).

Os principais mecanismos envolvidos na cardiotoxicidade que têm sido propostos e descritos na literatura são: o aumento do estresse oxidativo devido ao aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (SINGAL, P. et al, 2000; STEINHERZ, J. et al, 1991) alterações no transporte sarcolemal de cálcio (ASCENSÃO, A. et al, 2012; ROCHETTE, L. et al, 2015; ŠTĚRBA, M. et al, 2013) , alteração na expressão de proteínas estruturais, como a distrofina e beta-distroglicana, e de proteínas contráteis (CAMPOS, E.C. et al, 2011; PECORARO, M. et al, 2015), apoptose dos cardiomiócitos (ROCHETTE, L. et al, 2015; LU, P., 2005; VOLKOVA, M., RUSSELL, R., 2011; TACAR, O. et al, 2013), alterações na estrutura sarcomérica, alterações no conjunto de fosfatos de alta energia e o metabolismo de ferro (SALAZAR-MENDIGUCHÍA, J. et al, 2014) . São ainda propostos pela literatura outros mecanismos como: remodelamento da matriz extracelular (a doxorubicina inibe a transcrição e tradução da colagenase/metaloproteinase de matriz 1 (MMP-1) o que enfraquece a matriz de colágeno causando a cardiomiopatia) e o acúmulo de metabólitos tóxicos no miocárdio (através do metabolismo das antraciclínicas). Esse acúmulo inibe as bombas de trocas de íons cálcio e sódio provocando desequilíbrio na função cardíaca.

A cardiotoxicidade pode se manifestar de duas formas: aguda ou subaguda e crônica. A forma aguda ou subaguda é caracterizada pela ocorrência de alterações eletrocardiográficas súbitas que podem se manifestar na repolarização ventricular, no intervalo QT, na ocorrência de arritmias supraventriculares e ventriculares, ou mesmo de síndromes coronarianas agudas, pericardite e / ou miocardite. Estas alterações podem ser observadas desde o início da terapia até duas semanas após o término do tratamento (ALBINI, A. et al, 2010).

Com base no aparecimento de sintomas clínicos, a forma crônica pode ser diferenciada em dois subtipos. O primeiro ocorre precocemente, dentro de um ano após o término da quimioterapia, e o segundo tardiamente, mais de um ano após o tratamento. A manifestação mais comum da cardiotoxicidade crônica é a disfunção ventricular sistólica e / ou diastólica e, conseqüentemente, a insuficiência cardíaca congestiva o qual está associada ao elevado nível de mortalidade (KALIL FILHO, R. et al, 2011; ALBINI, A. et al, 2010).

As alterações cardíacas estruturais observadas com o uso de agentes antitumorais podem se apresentar de duas maneiras: tipo I, que ocorre com o uso dos fármacos da classe das antraciclinas (objeto desse estudo), cursando com lesões consideradas irreversíveis aos cardiomiócitos e que derivam de seus efeitos cumulativos, estando relacionadas, portanto, à dose administrada; o tipo II ocorre com o uso, por exemplo, do trastuzumab, um anticorpo monoclonal humanizado derivado da tecnologia do DNA-recombinante e com efeito antitumoral que não gera destruição celular irreversível e seus efeitos não estão relacionados à dose (EWER, M.S. et al, 2005).

As alterações morfológicas do miocárdio decorrentes do uso da doxorrubicina são descritas como degeneração vacuolar, desorganização ou perda de miofibrilas, fibrose intersticial, dilatação do retículo sarcoplasmático e lesão mitocondrial caracterizada por tumefação e rompimento de cristas mitocondriais (STEINHERZ, J. et al, 1991; DOROSHOW, J et al, 1985).

Essas lesões podem, a longo prazo, causar cardiomiopatia dilatada com conseqüente evolução para insuficiência cardíaca congestiva (ASCENSÃO, A. et al, 2012; SINGAL, P. et al, 1998) geralmente refratária à terapêutica medicamentosa convencional (ASCENSÃO, A. et al, 2012).

Modelos experimentais de insuficiência cardíaca (IC) podem mimetizar estas alterações fisiopatológicas e morfológicas, incluindo remodelamento cardíaco, alterações histológicas, queda da função ventricular com alterações hemodinâmicas, como diminuição do débito cardíaco e aumento da resistência vascular sistêmica. Estes modelos podem contribuir para o avanço no conhecimento do diagnóstico e das terapias em IC (COHN, J.N. et al, 1997; SCHWARZ, E.R. et al, 1998; O'CONNELL, J.L. et al, 2017).

Nesse contexto, as miocardiopatias induzidas por drogas constituem-se em modelos experimentais que mais se aproximam do objetivo de indução de uma IC semelhante àquela encontrada no ambiente clínico (SMITH, R. D. et al, 1985). Dentre as diversas drogas que já foram testadas para esta finalidade, a DOX é a mais intensamente usada na tentativa de criação de modelos de miocardiopatia dilatada e IC experimental (ANJOS FERREIRA, A.L. et al, 2007).

Insuficiência cardíaca

A insuficiência cardíaca pode ser definida como uma síndrome complexa caracterizada por falência do coração e incapacidade deste de propiciar suprimento adequado de sangue para atender às necessidades metabólicas dos tecidos na presença de pressões de enchimento normais ou fazê-lo somente com pressões de enchimento elevadas (NOGUEIRA P.R. et al, 2010).

Estudos de prevalência estimam que 23 milhões de pessoas no mundo apresentam IC e que dois milhões de casos novos são diagnosticados anualmente. O aumento na prevalência de IC está relacionado aos avanços terapêuticos no tratamento do infarto agudo do miocárdio, da hipertensão arterial e mesmo da IC, o que ocasiona maior sobrevida e, conseqüentemente, aumento de internações hospitalares por essa síndrome, gerando altos custos principalmente em países cuja população idosa é crescente (BATLOUNI, M. et al, 2000, ROSSI NETO, J.M. et al, 2004; BARRETO, A.C. et al, 1998).

Segundo dados do DATASUS, há no Brasil cerca de dois milhões de pacientes com IC, sendo diagnosticados 240 mil novos casos por ano. As projeções indicam que, em 2025, o Brasil terá a sexta maior população de idosos do mundo, com aproximadamente 30 milhões de pessoas nesta faixa etária (15% da população total) (BARRETO, A.C.P. et al, 2002). Isso deve resultar na multiplicação dos casos de IC e dos gastos com essa síndrome (NOGUEIRA P.R. et al, 2010). Apesar de inúmeros avanços na terapia farmacológica e não farmacológica da IC, o tratamento medicamentoso continua associado a uma taxa de sobrevida de apenas 50% em cinco anos (HO, K.K.L, 1993; REDFIELD, M.M. et al, 2000).

A IC pode ser classificada como sistólica ou diastólica, com débito cardíaco aumentado, preservado ou reduzido, com predominância de sinais e sintomas

decorrentes do comprometimento do lado esquerdo ou direito do coração e, ainda, podendo apresentar-se como aguda ou crônica (VILLELA, C.Q. et al, 2009).

A insuficiência cardíaca sistólica é caracterizada por redução da ejeção do sangue para a aorta e tronco da artéria pulmonar e depressão da contratilidade miocárdica. A insuficiência diastólica é caracterizada pelo esvaziamento inadequado do reservatório venoso sistêmico ou pulmonar que transporta sangue para o coração e comprometimento do enchimento e relaxamento ventriculares (KATZ, A. et al, 2012).

A disfunção cardíaca aguda pode estar relacionada à isquemia, distúrbios do ritmo, disfunção valvar, doença pericárdica, pressões elevadas de enchimento das câmaras cardíacas ou resistência sistêmica elevada. A insuficiência cardíaca aguda é usualmente caracterizada por congestão pulmonar. Em alguns pacientes, no entanto, a apresentação clínica dominante pode ser de baixo débito com hipoperfusão tecidual (RA, A. et al, 2009).

Relativamente à insuficiência cardíaca crônica, as disfunções sistólica e diastólica presentes são definidas em termos da alteração da arquitetura ventricular como tamanho, forma da cavidade e espessura da parede. A forma sistólica do ventrículo esquerdo caracteriza-se por um coração dilatado, de paredes finas (hipertrofia excêntrica), enquanto que a diastólica, tipicamente, se expressa por um ventrículo de paredes espessadas, não complacente, com dimensões reduzidas ou normais (hipertrofia concêntrica) (KATZ, A. et al, 2012).

De acordo com a American Heart Association (AHA), a classificação de insuficiência cardíaca crônica quanto à sua evolução, pode ser definida em quatro estágios: pacientes com insuficiência cardíaca estágio A são aqueles que se encontram em alto risco para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca, mas que ainda não têm nenhuma anormalidade estrutural aparente do coração. Pacientes com insuficiência cardíaca em estágio B apresentam anormalidade estrutural do coração, mas nunca tiveram sintomas de insuficiência cardíaca. A insuficiência cardíaca estágio C cursa com anormalidade estrutural do coração e sintomas clínicos; pacientes com insuficiência cardíaca estágio D, apresentam anormalidade estrutural do coração e quadro clínico refratário ao tratamento padrão.

A partir desta classificação da AHA, entende-se que a IC é, portanto, a via final comum da maioria das doenças que acometem o coração, sendo um dos mais

importantes desafios clínicos atuais na área da saúde (SEIXAS-CAMBAO, M. et al, 2009).

Com a dificuldade do coração em contrair-se com força suficiente, os tecidos corporais são privados de irrigação sanguínea adequada e podem surgir sintomas de dispneia decorrentes da congestão pulmonar, principalmente. Sendo assim, a insuficiência cardíaca apresenta características malignas, com alta mortalidade nas formas avançadas, sendo uma afecção muito limitante que pode resultar em fadiga ou dispneia progressiva até aos mínimos esforços (BARRETO, A.C.P. et al, 1998).

Um dos mecanismos compensatórios para atenuar o deficiente bombeamento de sangue pelo coração é o remodelamento ventricular. Este é um processo no qual participam fatores mecânicos, neuro-hormonais e possivelmente genéticos que alteram o tamanho, a forma e a função ventricular. O remodelamento cardíaco ocorre em várias condições clínicas, incluindo infarto do miocárdio, cardiomiopatia, hipertensão, e doença cardíaca valvar podendo levar à hipertrofia, perda de miócitos e aumento da fibrose intersticial (SUTTON, M. et al, 2000; EICHHORN, E.J. et al, 1996).

Os mecanismos compensatórios são desencadeados para sustentar a perfusão de órgãos vitais e estabilizar o desempenho do coração. O débito cardíaco reduzido e a resistência vascular sistêmica aumentada estimulam o sistema nervoso simpático, levando a um aumento da frequência cardíaca, do consumo de energia pelo miocárdio, à vasoconstrição sistêmica e à ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (FERRAZ, A.S. et al, 2006).

Por sua importância entre as principais causas de morbidade e mortalidade, esforços têm sido feitos para elucidar os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento e evolução da disfunção ventricular progressiva e da falência cardíaca e, a partir deste conhecimento, tenta-se identificar alvos terapêuticos potenciais com o intuito de prevenir, melhorar as condições clínicas e a qualidade de vida dos pacientes e, eventualmente, reverter a doença cardíaca desencadeadora da IC.

Algumas opções terapêuticas adicionaram resultados muito satisfatórios ao tratamento da IC, mas, infelizmente, várias delas tem-se mostrado muito dispendiosas e às vezes, inviáveis aos serviços de saúde. Nesse sentido, opções terapêuticas de custo mais baixo poderiam ser utilizadas para minimizar os sintomas de IC atenuando os efeitos deletérios causados pela DOX em pacientes que tiverem que ser submetidos ao tratamento antitumoral empregando este medicamento. Uma delas vem sendo proposta

e se trata do emprego, previamente ao tratamento antitumoral, de treinamento físico, uma ferramenta crucial nos programas de Reabilitação Cardiovascular por contribuir para melhora da tolerância aos esforços físicos.

Hormônio tireoidiano

Os hormônios tireoidianos possuem papel importante no crescimento, desenvolvimento e metabolismo do organismo. Um alvo da ação desses hormônios é o tecido cardíaco onde eles exercem grande influência promovendo alterações estruturais, funcionais e moleculares (MANN, D. et al, 2014).

Uma das doenças que está relacionada com o mau funcionamento da tireóide e pode levar a condições patológicas é o hipertireoidismo que decorre do excesso de produção e secreção de T3, T4 ou de ambos, resultantes da hiperatividade da glândula. Os sinais e sintomas associados ao hipertireoidismo incluem fadiga, perda de peso, hiperatividade, intolerância ao calor, palpitações, aumento da frequência cardíaca e hipertensão arterial sistólica (FERNANDES, R.O., 2010).

As manifestações cardiovasculares mais frequentes do hipertireoidismo são, portanto, taquicardia, arritmias e hipertensão arterial sistólica. Este estado cardiocirculatório hiperdinâmico é causado, tanto pela ação dos hormônios sobre a transcrição gênica de proteínas regulatórias e estruturais do coração, como pelo maior consumo de oxigênio causado pelo metabolismo elevado dos tecidos (MULLER, A.F. et al, 2008).

Outra doença relacionada ao mau funcionamento da tireoide é o hipotireoidismo definido como um estado clínico resultante da quantidade insuficiente dos hormônios circulantes da glândula tireoide para suprir uma função orgânica normal. Os sinais e sintomas associados ao hipotireoidismo incluem a redução do gasto energético de repouso com conseqüente aumento do peso corporal, níveis elevados de colesterol, redução da gliconeogênese e lipólise, cansaço, sonolência e intolerância ao esforço (MULLER, A.F. et al, 2008).

Esta enfermidade está relacionada ao desenvolvimento de desordens cardiovasculares como o aumento da resistência periférica, diminuição da contratilidade cardíaca por alterações na conformação estrutural da enzima ATPase, o que leva à

redução da função de bomba do coração, com conseqüente queda do débito cardíaco (GONÇALVES, A. et al, 2006).

Embora o excesso de T3 estimule o aumento do consumo de oxigênio do miocárdio, no hipotireoidismo a função de bomba se torna ineficiente e a restauração a níveis terapêuticos de T3 tem mostrado melhora da eficiência do consumo de oxigênio no miocárdio durante reperfusão pós-isquêmica (HSU, R. B. et al, 1995; KLEMPERER, J.D. et al, 1995).

É importante reconhecer, todavia, que o hipotireoidismo crônico, por si só, pode levar a um quadro de IC com muitas manifestações e sintomas indistinguíveis daqueles atribuídos a outras cardiopatias e podendo produzir refratariedade terapêutica.

Alguns estudos (KOUNTZ, W. B., 1950; BARNES, B.O., 1959; MARTINEZ, F., 2016; RAJAGOPALAN, V.; GERDES, A. M., 2015) mostraram que valores de T3 abaixo do normal podem levar a várias morbidades como doenças coronarianas, aumento dos níveis de colesterol, risco aumentado de infarto do miocárdio e aumento da mortalidade de causa cardiovascular. O tratamento de reposição até níveis normais (eutireoidismo) reduz estes riscos.

Khalife et al (2005) demonstraram que o tratamento com hormônio tireoidiano restaura o fluxo sanguíneo coronariano, reverte a fibrose cardíaca e previne a perda de miócitos em modelo animal de doença coronariana.

Ações diretas e indiretas dos hormônios tireoidianos

Os hormônios tireoidianos têm efeitos nucleares mediados pela ativação transcricional ou repressão dos genes alvos específicos que codificam proteínas estruturais ou funcionais (EVERTS, M. E. et al, 1996). Este processo inicia com a entrada de T3 no cardiomiócito através de proteínas de transporte específicas e localizadas no interior da membrana celular (BRENT, G.A., 1994). Uma vez no cardiomiócito, o T3 entra no núcleo e interage com os ativadores transcricionais específicos (receptor $\alpha 1$) ou repressores (receptor $\alpha 2$). A combinação de T3 a seus receptores ($\alpha 1$, $\alpha 2$), permite que o complexo receptor-hormônio ative ou reprima as sequências de DNA (TRE), modificando a taxa de transcrição dos genes-alvo específicos (OLJAMAA, K., 2010).

Dentre as várias proteínas cuja expressão é modulada a nível transcricional, as mais expressadas são as cadeias pesadas de miosina (MHC), proteína do retículo sarcoplasmático Ca^{2+} ATPase (SERCA) e fosfolambam (PLC). A MHC é um dímero composto por filamentos alfa e beta, produtos de dois genes diferentes. SERCA é uma enzima (Ca^{2+} ATPase) que transfere Ca^{2+} a partir do citosol da célula para o lúmen do retículo endoplasmático à custa da hidrólise de ATP durante o relaxamento do músculo. Fosfolambam é uma proteína que inibe a atividade de SERCA no estado não fosforilado (EVERTS, M. E. et al, 1996).

O hormônio tireoidiano parece modificar a expressão de outros canais iônicos, tais como Na^+/K^+ ATPase, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e alguns canais voltagem dependentes, como os de K^+ . Desse modo, coordena as respostas eletrofisiológicas e mecânicas do coração (OJAMAA, K. et al, 1996).

Os efeitos indiretos do hormônio tireoidiano provocam mudanças importantes na hemodinâmica, pois exercem um importante papel no sistema vascular reduzindo a resistência periférica ao promover o relaxamento das células musculares lisas das paredes vasculares (CHEN, YF et al, 2013). Além de seus efeitos vasodilatadores, estudos sugerem que o hormônio tireoidiano tem importantes efeitos nos microvasos no coração, promovendo angiogenese (ROFFI, M. et al, 2003).

Testes clínicos e experimentais sugerem que as adaptações cardíacas são resultadas de efeitos diretos do hormônio sobre o coração e os vasos e, indiretamente, decorrem da elevação sérica de catecolaminas (VENDITTI, P. et al, 2006). Ademais, apresentam ação importante sobre a regulação do metabolismo basal de diversos tecidos, tais como o músculo esquelético, fígado, rins e cérebro (BARATA, T. et al, 1997). Porém, ainda precisa ser elucidado se o uso do hormônio tireoidiano pode contribuir para a minimização dos efeitos deletérios da IC no músculo cardíaco.

Exercício físico

Outra abordagem que traz benefícios ao tratamento da IC é o treinamento físico, o qual provoca inúmeras adaptações morfofuncionais que ocorrem tanto a nível central como periférico (FAGARD, R., 2003; HAYKOWSKY, M. et al, 2014). É importante comentar que, além das alterações cardiovasculares sistêmicas causadas pela IC, um dos principais fatores causadores de limitações físicas e intolerância às mínimas atividades

habituais nesses indivíduos, é a miopatia que se caracteriza por redução no número e densidade de capilares, redução do número e tamanho de mitocôndrias, a predominância de fibras musculares de característica glicolítica anaeróbia (brancas), menor conteúdo de mioglobina e modificações na reatividade vascular por alterações no endotélio vascular (NEGRÃO, C.E. et al, 1992).

O exercício pode ser benéfico na minimização da intolerância ao esforço e da fadiga precoce por promover adaptações na frequência cardíaca, um dos principais efeitos do treinamento físico (KALIL, L.M.P., 1997; MEDEIROS, A. et al, 2000), e na pressão arterial de repouso (KALIL, L.M.P., 1997; FREYSSIN, C. et al, 2012).

Além dos seus efeitos favoráveis sobre a função cardiovascular, o treinamento físico tem efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, reduzindo ainda a resistência vascular, a disfunção endotelial, restaurando o equilíbrio neuro-humoral e a hemodinâmica, refletindo, tudo isso, na melhora da capacidade funcional global e da qualidade de vida, principalmente em indivíduos com IC (BARBIER, J. et al, 2006).

Outro aspecto a ser analisado diz respeito à hipertrofia cardíaca (HC) induzida pelo treinamento físico. Esta remodelação cardíaca decorrente do exercício físico caracteriza-se pelo aumento de massa muscular em resposta à sobrecarga de trabalho imposta ao coração nas sessões de treinamento (CARREÑO, J.E. et al, 2006; KATCH, F.I. et al, 1991) sendo, em geral, do tipo fisiológica, e é benéfica ao sistema cardiovascular. Ocorre, concomitantemente, diminuição da frequência cardíaca de repouso e aumento do tempo de enchimento ventricular, com consequente elevação do volume sistólico. Esses ajustes ajudam o coração a suprir as exigências derivadas do exercício físico (MAGALHÃES, F.C. et al, 2008).

O treinamento físico inclui atividades de padrão predominantemente aeróbio ou anaeróbio. O treinamento do tipo aeróbio ocasiona HC excêntrica devido à sobrecarga de volume provocada pelo aumento da pré-carga que ocorre em consequência do aumento do retorno venoso, fato este capaz de gerar um pico elevado de tensão diastólica. Para tentar normalizar o estresse no miocárdio provocado por tal evento, ocorre crescimento dos cardiomiócitos por adição de sarcômeros em série e aumento de miofibrilas. A resposta subsequente é a HC concêntrica por adição de sarcômeros em paralelo (STEDING, K. et al., 2010; MORGANROTH, J. et al, 1975).

Com base na revisão de literatura acima, levantamos as seguintes questões: o tratamento com hormônio tireoidiano e com exercício físico, seja de forma isolada ou

em associação, contribui para melhora da tolerância ao esforço e das alterações estruturais nos miofilamentos na cardiotoxicidade induzida pelo antineoplásico doxorrubicina? Quais seriam os achados funcionais no sistema cardiovascular que poderiam estar relacionados aos achados morfológicos?

Apesar dos significativos avanços terapêuticos conseguidos nas últimas décadas, a mortalidade da insuficiência cardíaca continua elevada e a morbidade decorrente prejudica a qualidade de vida. Neste aspecto, várias tentativas para o controle dos sintomas e da evolução da insuficiência cardíaca vêm sendo desenvolvidas utilizando-se novos conceitos fisiopatológicos, farmacológicos e várias estratégias terapêuticas.

As ações inotrópicas, vasodilatadoras e hipertróficas do hormônio tireoidiano vêm sendo analisadas pelo nosso grupo de pesquisa apresentando resultados preliminares promissores (SOUZA, F.R. et al., 2014). Da mesma maneira, o exercício físico isoladamente ou associado ao hormônio tireoidiano, também otimizaria os parâmetros hemodinâmicos justificando a sua utilização em modelos de estudo da insuficiência cardíaca.

Ademais, será importante também avaliar as alterações estruturais no miocárdio desses animais e relacioná-los com a função cardíaca avaliada in vivo pela ecocardiografia. Dessa forma a cardiotoxicidade induzida pela DOX e as alterações estruturais no miocárdio, em associação ao tratamento com hormônio tireoidiano e ao exercício físico, permitirá uma avaliação de modo sistematizado e poderá apontar um caminho a ser seguido em futuras investigações e novas abordagens no avanço do tratamento da cardiotoxicidade induzida pela DOX.

HIPÓTESE

As seguintes hipóteses de trabalho serão enfocadas nesta tese:

1 - No limite de nosso conhecimento, não há, na literatura pesquisada até o presente momento, referências quanto ao emprego de treinamento físico como terapêutica coadjuvante sendo esta iniciada após o período de exposição ao agente antitumoral. A importância de se verificar se este efeito protetor também está presente quando iniciado após o tratamento com a DOX decorre do fato de que a cardiopatia só se manifesta, clinicamente, em 5 a 35% dos indivíduos tratados e surge, principalmente, em doses cumulativas acima de 400mg/m^2 de superfície corporal. A possibilidade de

uso do treinamento também após o curso do tratamento poderia adicionar conhecimento quanto à fisiopatologia da doença.

2 - Quanto ao uso do hormônio tireoidiano, também desconhecemos modelos experimentais que o tenham utilizado neste modelo de cardiopatia produzido pela DOX e, principalmente, quando ele é adicionado ao tratamento após o uso do agente antitumoral. A importância desta avaliação isolada do hormônio tireoidiano, ou deste adicionado ao exercício físico, é demonstrar o grau de segurança terapêutica nos animais, verificar se há uma janela de utilidade de seu uso neste modelo de IC e, ao mesmo tempo, testar a hipótese de que o hormônio pode ser útil no tratamento da cardiotoxicidade decorrente e que pode ser utilizado após o emprego da DOX.

OBJETIVO

Objetivo Geral

Analisar os efeitos do hormônio tireoidiano e do treinamento físico na cardiotoxicidade induzida por DOX em ratos, através da avaliação da resposta da tolerância ao esforço físico, das alterações estruturais do miocárdio e da função cardíaca.

MATERIAIS E MÉTODOS

Considerações gerais

O estudo conduzido foi do tipo experimental. Os procedimentos foram realizados após aprovação do Protocolo de Pesquisa 022/14, pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia. Todos os procedimentos seguiram os padrões definidos pelo comitê de ética responsável.

Foram utilizados 60 ratos da linhagem Wistar, machos, adultos, com peso inicial de aproximadamente 250 gramas, provenientes do laboratório do Centro de Biotério e Experimentação Animal (CEBEA-UFU) onde foi desenvolvido o experimento. As condições ambientais para todos os grupos foram as mesmas, no que se refere à temperatura (25°), umidade relativa do ar, nível de ruído e luminosidade (ciclo claro/escuro 12h/12h). Os animais foram alimentados com ração e água “*ad libitum*”.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

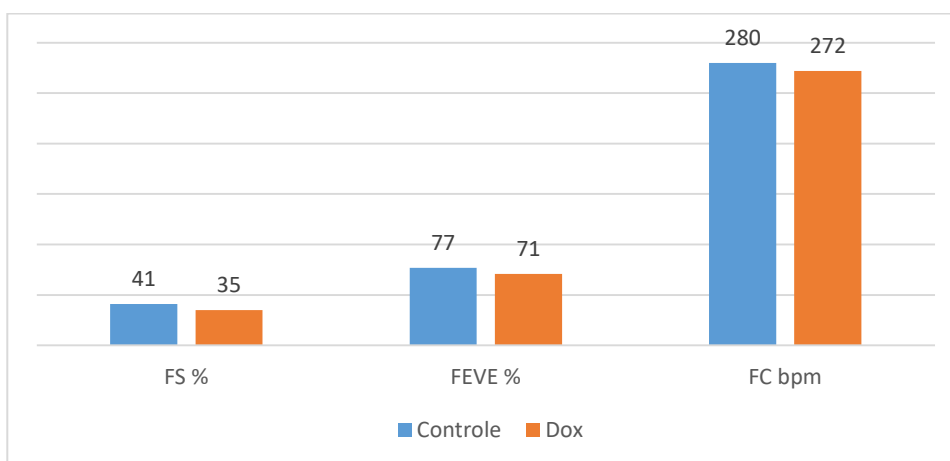
Indução da insuficiência cardíaca: injeção de Doxorubicina

Os animais foram divididos em sete grupos identificados como: controle (C), exercício (EX), hormônio tireoidiano (HT), doxorubicina (DX), doxorubicina e exercício (DXEX), doxorubicina e hormônio (DXHT) e doxorubicina, exercício e hormônio (DXEXHT).

Os animais que pertenciam aos grupos DX, DXEX, DXHT, DXEXHT, receberam injeções intraperitoneais de cloridrato de doxorubicina (Fauldoxo, Libbs Farmacêutica, Embú, São Paulo), três vezes por semana, ao longo de duas semanas, atingindo a dose cumulativa de 7,5 mg/kg (CAMPOS, E.C. et al., 2011). Os grupos C, EX e HT receberam volume igual de solução salina, no mesmo regime empregado para os animais tratados com doxorubicina.

Após duas semanas de intervalo entre a aplicação da doxorubicina e o início do tratamento com exercício físico e hormônio tireoidiano, foi realizado ecocardiograma de 6 animais (3 animais do grupo C e 3 animais do grupo DX) para avaliação da função cardíaca. O grupo DX apresentou uma tendência de valores mais baixos da fração de encurtamento, fração de ejeção e frequência cardíaca em comparação ao grupo C o que pode indicar um padrão de disfunção cardíaca. Esses resultados serviram de orientação para o experimento principal. Os valores estão demonstrados no gráfico abaixo:

Gráfico 1 : Resultado do ecocardiograma após duas semanas de aplicação doxorubicina



Os valores correspondem à média. FS – Fração de encurtamento. FEVE – Fração de ejeção; FC – Frequência cardíaca.

Tratamento: hormônio tireoidiano e treinamento físico

Após o término das injeções de doxorrubicina, houve um intervalo de duas semanas (CAMPOS, E.C. et al., 2011) para ser iniciado o protocolo de exercício e o tratamento com hormônio.

Aos grupos HT, DXHT e DXEXHT foram administrado hormônio tireoidiano como descrito abaixo:

Administração de levotiroxina sódica

- A levotiroxina sódica (T4) foi administrada diariamente, durante quatro semanas, por meio de sondagem orogástrica, utilizando-se o instrumento IC 810 (agulha de gavagem para ratos) de aço inox BD-12, com cânula com diâmetro de 1,2mm, com esfera 2,3mm, raio de 40 mm e comprimento de 54 mm. A dose administrada foi de 10 μ g/100g de peso corporal em uma suspensão de tiroxina (levotiroxina sódica) a 0,1% que foi obtida a partir de 10 comprimidos de 100 μ g de T4 diluídos em 10 ml de água destilada (ENGELMAN, M.F.B. et al, 2001).

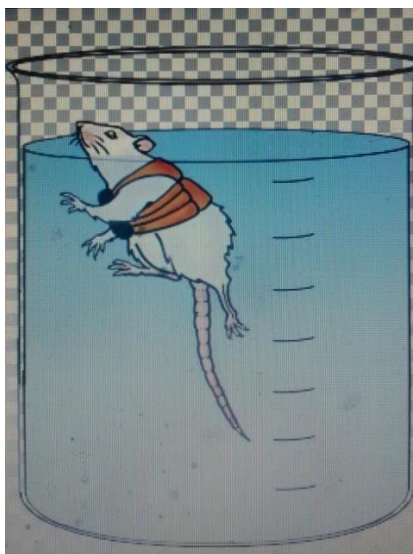
Treinamento físico

Os grupos EX, DXEX e DXEXHT realizaram o treinamento físico, como descrito abaixo:

- Um período inicial de adaptação foi proporcionado colocando-se os animais em contato com água rasa, à temperatura de 32 \pm 2°C, por 30 minutos, durante 1 semana, 5 dias por semana. O propósito da adaptação foi reduzir o estresse dos animais frente ao exercício físico realizado na água (GOBATTO, C.A et al., 2001).

- O exercício utilizado foi a natação, com carga adicional correspondente à 5% do peso corporal do animal (GOBATTO, C.A. and SIBUYA, C. Y., 2001). Para o treinamento foi utilizado um vidro com 250mm de diâmetro (GOBATTO, C.A. et al., 2001). A altura da coluna de água no vidro foi correspondente a 150% do comprimento corporal do rato e a temperatura da água foi mantida entre 30°C e 32°C por ser considerada neutra em relação à temperatura corporal do rato (HARRI, M. e KUUSELA, P., 1986), como demonstrado na figura abaixo:

Figura 1: Imagem ilustrativa de um rato nadando.



Gonçalves, 2015.

O treinamento físico foi conduzido durante quatro semanas, com três sessões semanais de natação. A referida carga adicional de trabalho consistiu de blocos de chumbo fixados em um colete preso na região anterior do tronco dos ratos. A carga foi reajustada semanalmente, conforme a variação do peso dos animais. A periodização do treinamento físico está demonstrada na Tabela 1.

Tabela 1: Periodização do treinamento físico dos animais

Semana	Carga	Dia/tempo em min por sessão		
		Segunda-feira	Quarta-feira	Sexta-feira
1	5%	10	15	15
2	5%	20	25	25
3	5%	30	35	35
4	5%	40	40	40

Ecocardiografia

Os parâmetros da função sistólica utilizados foram a fração de encurtamento e a fração de ejeção.

Para obtenção das imagens ecocardiográficas, os animais foram anestesiados com associação de ketamina (Ketamina 10%, Agener União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP, Brasil, 74 mg/kg) e xilazina (Dopaser, Laboratórios Calier, SA, Barcelona, Espanha, 8 mg/kg) administrados por via intraperitoneal e

permitindo ao animal manter a respiração espontânea durante o exame. Após anestesia, foi realizada a tricotomia da região anterior do tórax.

O ecocardiograma foi realizado utilizando-se o equipamento ESAOTE modelo *MyLab VET 30 gold*, gerando imagens nos modos uni e bidimensional. Utilizou-se transdutor setorial com frequência de 8 Mhz, profundidade de 3,0 cm, e ângulo setorial de 75°. No modo M, ao corte transversal paraesternal direito no plano das cordoalhas tendíneas, foi mensurado o diâmetro do ventrículo esquerdo durante a diástole (DIVED) e sístole (DIVES) para posterior cálculo da fração de encurtamento (FS) pela fórmula $FS\% = [(DIVED - DIVES) / DIVED] \times 100$. No mesmo corte foram medidos os volumes diastólico (VVED) e sistólico (VVES), pelo método de Teicholz, para posterior cálculo da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) pela fórmula $FEVE = [(VVED - VVES) / VVED] \times 100$, e obtida a frequência cardíaca.

Teste de tolerância ao esforço físico

Um teste exaustivo de natação foi realizado 48 horas após a última sessão de treinamento físico. Os animais nadaram até a exaustão, suportando um peso de 5% do peso corporal afixado ao corpo. A exaustão foi definida como o ponto em que o animal permanecia 10 segundos sob a superfície da água (GOBATTO, C.A. et al, 2001; DAWSON, C.A. and HORVATH, S.M., 1970). O tempo de exercício até a exaustão foi cronometrado.

Coleta do material

Ao final do tratamento, os animais foram pesados e anestesiados com ketamina (Ketamina 10%, Agener União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP, Brasil, 80 mg/kg) e xilazina (Dopaser, Laboratórios Calier, S/A, Barcelona, Espanha, 8 mg/kg) administrados por via intraperitoneal. Nestas condições procedeu-se à abertura do tórax para a coleta do sangue por punção cardíaca direta e para a remoção do coração. Em seguida os corações foram lavados com solução de NaCl 0,9%, secos em papel filtro e pesados em balança de precisão. Após este procedimento foram retirados os átrios e separados os ventrículos; parte deste material foi encaminhado para processamento histológico e a outra parte foi encaminhado para realização de análises proteicas.

Análises laboratoriais

Após a punção cardíaca, as amostras de sangue foram colocadas em tubos de ensaio VACUETTE® com gel separador e levadas ao laboratório de análises clínicas do Hospital Veterinário da UFU para análise. Para determinação de triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) foram utilizados os kits da marca INTERKIT® e a análise foi feita através do método de ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA).

Microscopia óptica convencional

Os corações foram fixados por imersão em formol tamponado a 10% por um período de 24 horas e em seguida encaminhados para análise histopatológica. As amostras foram desidratadas em soluções crescentes de álcool 80%, 95% (30 minutos cada) e 100% (quatro trocas de uma hora cada). Após o último procedimento, as amostras foram clarificadas em xilol (três banhos de 30 minutos cada), receberam dois banhos de parafina (duas horas cada) e incluídas em parafina. Cada bloco de parafina foi cortado em secções de 5µm de espessura e, posteriormente, corados com hematoxilina e eosina.

Western blot

Amostras de tecido cardíaco foram coletadas para a quantificação da miosina (n=5 animais por grupo), colocadas em tubos de Eppendorf de 2ml e imediatamente congeladas a -80°C até o momento da extração de proteínas. Foi adicionado ao Eppendorf o tampão de extração com inibidores de protease e de fosfatase e, em seguida, o tecido foi triturado em Polytron. O material foi centrifugado a 13.000rpm por 20 minutos, à 4°C, o sobrenadante congelado a -80°C e posteriormente utilizado para a dosagem de proteínas. A dosagem de proteínas foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 595nm pelo método de Coomassie R. As proteínas foram separadas por eletroforese (100 volts por 1h 40 min) e então transferidas para membrana de nitrocelulose (100 volts por 2 horas em tampão de transferência). Após, as membranas foram coradas por Ponceau para marcação das proteínas. Em seguida, as membranas foram lavadas em água deionizada e colocadas em solução de bloqueio *overnight*. Após esse procedimento, as membranas foram incubadas com anticorpo primário *overnight*. Após as lavagens com tampão TBS-T, foi colocado o anticorpo

secundário conjugado à peroxidase à temperatura ambiente, por 40 minutos. Por último, as membranas foram reveladas com kit para detecção de proteínas ECL e analisadas através do aparelho ChemiDoc XRS (BioRad Laboratories).

RESULTADOS

A partir da metodologia descrita foram coletadas informações e produzidos dois artigos apresentados abaixo:

Artigo 1: “TOLERÂNCIA AO ESFORÇO FÍSICO APÓS ADMINISTRAÇÃO DE DOXORRUBICINA: EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO E DO HORMÔNIO TIREOIDIANO”.

Artigo 2: “O TREINAMENTO FÍSICO PRESERVA A ESTRUTURA E A FUNÇÃO CARDÍACAS DE RATOS APÓS TRATAMENTO COM DOXORRUBICINA”.

TOLERÂNCIA AO ESFORÇO FÍSICO APÓS ADMINISTRAÇÃO DE DOXORRUBICINA: EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO E DO HORMÔNIO TIREOIDIANO.

Physical tolerance after use of doxorubicin: physical training and thyroid hormone effects.

Tolerância ao esforço e doxorrubicina.

Fernanda Rodrigues de Souza¹

Danilo Lemes Naves Gonçalves²

Érica Carolina Campos Pulici³

Clesnan Mendes Rodrigues⁴

Leonardo Roever¹

Elmiro Santos Resende⁵

¹ Doutoranda em Ciências da Saúde – PGCS, Universidade Federal de Uberlândia - UFU, Uberlândia, MG, Brasil.

² Graduado em Medicina – FAMED, Universidade Federal de Uberlândia – UFU, Uberlândia, MG, Brasil.

³ Faculdade de Educação Física, Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brasil

⁴ Hospital de Clínicas de Uberlândia, Instituto de Biologia, Estatística, UFU.

⁵ Serviço de Cardiologia (Laboratório de Medicina Experimental), Hospital de Clínicas de Uberlândia, Universidade Federal de Uberlândia, MG, Brasil

Resumo: A doxorubicina (DOX) é um agente quimioterápico que, além de suas propriedades antineoplásicas, também desencadeia efeitos tóxicos sobre o coração, podendo causar insuficiência cardíaca e consequente intolerância aos esforços. O objetivo deste estudo foi verificar a tolerância ao esforço em ratos após a aplicação de um protocolo de treinamento físico regular e/ou tratamento com hormônio tireoidiano, ambos iniciados após a administração de DOX. Foram utilizados 52 ratos Wistar machos, adultos, divididos aleatoriamente em sete grupos, identificados como: controle (C), controle exercício (CEX), controle hormônio tireoidiano (CHT), controle doxorubicina (CDX), doxorubicina e exercício (DXEX), doxorubicina e hormônio (DXHT) e doxorubicina, exercício e hormônio (DXEXHT). Os animais dos grupos CDX, DXEX, DXHT e DXEXHT, receberam injeções intraperitoneais de cloridrato de doxorubicina, três vezes/semana durante duas semanas, até atingir-se a dose cumulativa de 7,5 mg/kg. Aos grupos CHT, DXHT e DXEXHT foi administrado hormônio tireoidiano diariamente, por gavagem, na dose de 10µg/100g de peso corporal, durante quatro semanas. Os dois tratamentos foram iniciados duas semanas após o término da administração de DOX. Os grupos CEX, DXEX e DXEXHT participaram de um protocolo de natação com carga adicional de 5% do peso corporal também iniciado duas semanas após o término da administração de DOX. O treinamento foi conduzido ao longo de quatro semanas com três sessões semanais de natação. Quarenta e oito horas após a última sessão de treinamento, os animais de todos os grupos foram submetidos a um teste exaustivo de natação, que consistia em nadar até a exaustão, com a sobrecarga de 5% do peso corporal fixado ao corpo. Para análise estatística utilizou-se a distribuição de Poisson, adotando-se o nível de significância de 5%. A tolerância ao esforço (TE) no grupo CEX foi maior quando comparada aos demais grupos experimentais. O HT ministrado após DX aumentou a TE de forma menos eficaz do que o treinamento físico. O protocolo de exercício utilizado após o uso de DX aumentou a TE e a associação com HT não potencializou este efeito. Concluímos que o treinamento com exercício físico regular e de baixa intensidade e o hormônio tireoidiano utilizados após o uso de doxorubicina melhoraram a tolerância ao esforço dos animais.

Palavras-chave: tolerância ao esforço, insuficiência cardíaca, doxorubicina, treinamento físico, levotiroxina sódica

Abstract: Doxorubicin is a chemotherapeutic agent that beyond its anti-neoplastic properties has toxic effects on the heart and can lead to heart failure and low effort tolerance. The objective of this study is to verify the effort tolerance in rats using an experimental model of doxorubicin-induced cardiomyopathy after the application of a protocol of regular physical training and treatment with the thyroid hormone initiated after the administration of doxorubicin. Fifty-two adult male Wistar rats were randomly divided to seven groups identified as control (C), exercise (CEX), thyroid hormone (CHT), doxorubicin (CDX), doxorubicin and exercise (DXEX), doxorubicin and thyroid hormone (DXHT) and doxorubicin, exercise and hormone (DXEXHT). The animals from CDX, DXEX, DXHT e DXEXHT groups received intraperitoneal injections of doxorubicin hydrochloride, three times a week, for two weeks, reaching a cumulative dose of 7.5mg/kg. To the groups CHT, DXHT and DXEXHT was administered thyroid hormone once a day, for four weeks, by orogastric probe, at a dose of 10µg/100g of body weight. The groups CEX, DXEX e DXEXHT performed exercise using swimming for four weeks with three sessions per week. The exercise was performed using a loading up to 5% of body weight. Forty-eight hours after the last training session, animals from all groups underwent a thorough swimming test, which consisted of swimming to exhaustion, with an overload of 5% of body weight fixed to the body. For statistical analysis was used the Poisson distribution adopting the significance level of values <5%. The exercise tolerance in the CEX group was higher compared to the other experimental groups. The addition of thyroid hormone to exercise after doxorubicin did not increase exercise tolerance. The thyroid hormone administered after doxorubicin improved exercise tolerance but it was less effective than physical exercise. Treatment with physical exercise alone after the use of doxorubicin increased the exercise tolerance but the addition of thyroid hormone did not potentiate this action. In conclusion, training with regular and low intensity exercise and thyroid hormone after the use of doxorubicin improved the effort tolerance of the animals.

Keywords: physical tolerance, heart failure, doxorubicin, exercise, levothyroxine sodium

INTRODUÇÃO

A doxorrubicina (DOX) é um agente quimioterápico que apresenta, além de suas propriedades antineoplásicas, efeitos tóxicos sobre o coração. Esta cardiotoxicidade pode provocar disfunção do coração e insuficiência cardíaca (IC) produzindo graus variados de limitação às atividades físicas cotidianas (Francis, 2001). A IC é um dos mais importantes desafios clínicos e é a maior causa de mortalidade no Brasil e no mundo (Katz and Konstam, 2012; Jessap and Brozema, 2012). Apesar de terem ocorrido avanços na terapia farmacológica e não farmacológica, a IC continua associada a uma taxa de sobrevida de apenas 50% em cinco anos (Ho et al, 1993; Redfield et al, 2000).

Modelos experimentais de IC tentam mimetizar as condições gerais encontradas nesta síndrome, incluindo remodelamento cardíaco, alterações histológicas, piora da função ventricular e modificações hemodinâmicas, como diminuição do débito cardíaco e aumento da resistência vascular sistêmica. Estes modelos podem contribuir para o avanço do conhecimento nesta área bem como permitir testes para novas abordagens terapêuticas na IC (Cohn et al, 1997; Schwarz et al, 1998; Smith et al, 1985).

Nesse sentido, o exercício físico constitui uma opção terapêutica de baixo custo que pode ser utilizada com o objetivo de minimizar os efeitos deletérios causados pela cardiopatia induzida por doxorrubicina e melhorar a tolerância aos esforços físicos. Alguns estudos apontam o efeito protetor do treinamento físico quando utilizado previamente à administração da DOX (Chicco et al, 2006; Wonders et al, 2008; Hydock et al, 2008). O exercício físico provoca inúmeras alterações morfofuncionais, tanto a nível central como periférico (Sullivan and Hawthorne, 1995; Lu et al, 2015; Golbidi and Laher, 2011), que podem auxiliar no tratamento da IC. Além das alterações cardiovasculares benéficas que o exercício físico produz, ele também melhora as alterações musculoesqueléticas, um dos principais fatores causais de limitações físicas e intolerância às atividades físicas habituais nas cardiopatias que evoluem para IC. Estas alterações se caracterizam por redução no número e densidade de capilares e do número e tamanho de mitocôndrias; os efeitos do exercício físico incluem também modificações no padrão de fibras musculares esqueléticas com predominância de fibras de característica glicolítica anaeróbia, com menor conteúdo de mioglobina. Ocorrem ainda alterações na reatividade vascular devido a modificações no endotélio vascular (Haykowsky et al, 2014).

Outra opção terapêutica a ser testada no modelo de cardiomiopatia é a utilização de baixas doses do hormônio tireoidiano (HT). Devido aos seus efeitos sobre o sistema cardiovascular, onde exercem grande número de influências promovendo alterações moleculares, estruturais, funcionais (Dillmann, 2002; Corssac et al, 2016) e hipertrofia cardíaca, o HT pode desempenhar papel importante na IC.

Apesar dos significativos avanços terapêuticos conseguidos nas últimas décadas, a mortalidade por cardiopatias que evoluem para insuficiência cardíaca continua elevada e a morbidade decorrente desta evolução prejudica a qualidade de vida. Neste aspecto, várias tentativas para o controle dos sintomas e da evolução da doença vêm sendo desenvolvidas utilizando-se novos conceitos farmacológicos e estratégias terapêuticas.

Dessa forma, nosso objetivo foi verificar a tolerância ao esforço em ratos, utilizando-se um modelo experimental de miocardiopatia induzida por doxorubicina, após a aplicação de um protocolo de treinamento físico regular e tratamento com o hormônio tireoidiano, ambos iniciados após a administração de DOX

MATERIAIS E MÉTODOS

Considerações gerais

O estudo conduzido foi do tipo experimental. Os procedimentos foram realizados após aprovação do protocolo de pesquisa 022/14 pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia. Todos os procedimentos seguiram os padrões definidos pelo comitê de ética responsável.

Foram utilizados 60 ratos da linhagem Wistar, machos, adultos com peso inicial de aproximadamente 250 gramas, provenientes do laboratório do Centro de Bioterrorismo e Experimentação Animal (CEBEA-UFU) onde foi desenvolvido o experimento. As condições ambientais para todos os grupos foram as mesmas, no que se refere à temperatura (25°), umidade relativa do ar, nível de ruído e luminosidade (ciclo claro/escuro 12h/12h). Os animais foram alimentados com ração e água “*ad libitum*”.

Protocolos

Os animais foram divididos em sete grupos identificados como: controle (C), controle exercício (CEX), controle hormônio tireoidiano (CHT), controle doxorubicina (CDX), doxorubicina e exercício (DXEX), doxorubicina e hormônio (DXHT) e doxorubicina, exercício e hormônio (DXEXHT). Os animais do grupo controle não foram submetidos a nenhuma intervenção durante o experimento.

Administração de doxorubicina

Os animais que pertenciam aos grupos CDX, DXEX, DXHT, DXEXHT, receberam injeções intraperitoneais de cloridrato de doxorubicina (Fauldoxo, Libbs Farmacêutica, Embú, São Paulo), três vezes por semana, ao longo de duas semanas, atingindo a dose cumulativa de 7,5 mg/kg (Campos et al, 2011). Os grupos C, CEX e CHT receberam volume igual de solução salina, no mesmo regime empregado para os animais tratados com doxorubicina.

Tratamento: hormônio tireoidiano e exercício físico

Após o término das injeções de doxorubicina, houve um intervalo de duas semanas até ser iniciado o protocolo de exercício e o tratamento com hormônio.

Aos grupos CHT, DXHT e DXEXHT foi administrado hormônio tireoidiano como descrito abaixo:

Administração de levotiroxina sódica

- A levotiroxina sódica (T4) foi administrada diariamente, durante quatro semanas, por meio de sondagem orogástrica, utilizando-se o instrumento IC 810 (agulha de gavagem para ratos) de aço inox BD-12, com cânula com diâmetro de 1,2mm, com esfera de 2,3mm, raio de curvatura de 40mm e comprimento de 54mm. A dose administrada foi de 10µg/100g de peso corporal de uma suspensão de tiroxina (levotiroxina sódica) a 0,1%, que foi obtida a partir de 10 comprimidos de 100µg de T4 diluídos em 10ml de água destilada (Engelman et al, 2001).

Os grupos CEX, DXEX e DXEXHT realizaram o treinamento físico, como descrito abaixo:

- Um período inicial de adaptação foi proporcionado colocando-se os animais em contato com água rasa, à temperatura de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$, por 30 minutos, durante 1 semana, 5 dias por semana. O propósito da adaptação foi reduzir o estresse dos animais frente ao exercício físico realizado na água (Gobatto et al, 2001).

- O exercício utilizado foi a natação, com carga adicional e cumulativa até 5% do peso corporal do animal (Gobatto e Sibuya, 2001). Para o treinamento foi utilizado um vidro com 250mm de diâmetro (Gobatto et al, 2001). A altura da coluna de água no vidro foi correspondente a 150% do comprimento corporal do rato. A temperatura da água foi mantida entre 30°C e 32°C por ser considerada neutra em relação à temperatura corporal do rato (Harri e Kuusela, 1986).

O treinamento físico foi conduzido durante quatro semanas, com três sessões semanais de natação. A referida carga adicional de trabalho consistiu de blocos de chumbo fixados em um colete preso na região anterior do tronco dos ratos. A carga foi reajustada semanalmente, conforme a variação do peso dos animais. A periodização do treinamento físico está demonstrada na Tabela 1.

Tabela 1: Periodização do treinamento físico dos animais

Semana	Carga	Dia/tempo em min por sessão		
		Segunda-feira	Quarta-feira	Sexta-feira
1	5%	10	15	15
2	5%	20	25	25
3	5%	30	35	35
4	5%	40	40	40

Ecocardiografia

Para mensurar os valores da fração de ejeção e parâmetros anatômicos, os animais foram anestesiados com associação de ketamina na dose de 74mg/kg (Ketamina 10%, Agener União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP, Brasil) e xilazina na dose de 8mg/kg (Dopaser, Laboratórios Calier, SA, Barcelona, Espanha), administradas por via intraperitoneal e permitindo ao animal manter a respiração espontânea durante o exame. Após anestesia, foi realizada a tricotomia da região anterior do tórax.

O ecocardiograma foi realizado utilizando-se o equipamento ESAOTE modelo MyLab VET 30 Gold, gerando imagens nos modos uni e bidimensional. Utilizou-se transdutor setorial com frequência de 8Mhz, profundidade de 3,0cm, e ângulo setorial de 75°. No modo M, ao corte transversal paraesternal direito e no plano das cordoalhas tendíneas, foi mensurado o diâmetro do ventrículo esquerdo durante a diástole (DIVED) e sístole (DIVES) para posterior cálculo da fração de encurtamento (FS) pela fórmula $FS\% = [(DIVED - DIVES) / DIVED] \times 100$. No mesmo corte foram medidos os volumes diastólico (VVED) e sistólico (VVES), pelo método de Teicholz, para posterior cálculo da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) pela fórmula $FEVE = [(VVED - VVES) / VVED] \times 100$.

Teste de tolerância ao esforço físico

Um teste de tolerância (TE) foi realizado 48 horas após a última sessão de treinamento físico. Os animais nadaram até a exaustão, suportando um peso de 5% do

peso corporal afixado ao corpo. A exaustão foi definida como o ponto em que o animal permanecia 10 segundos sob a superfície da água (Gobatto et al, 2001; Dawson and Horvath, 1970). O tempo de exercício até a exaustão foi cronometrado.

Análises estatísticas

Para analisar o comportamento da fração de ejeção do ventrículo esquerdo nos diversos tratamentos foi utilizado o método de Modelos Lineares Generalizados (MLG) com distribuição gaussiana e função de ligação de identidade. Como se verificou diferença entre pelo menos dois tratamentos, os mesmos foram comparados, par a par, com o teste da diferença mínima significativa (LSD).

O tempo até a exaustão foi medido como uma variável discreta e não mostrou distribuição Gaussiana, conforme teste de Kolmogorov-Smirnov ($p = 0,024$). Por esta razão, as médias entre os tratamentos foram comparadas com os Modelos Lineares Generalizados (GLM) que adotaram a probabilidade de Poisson, função de distribuição e função de ligação logarítmica.

Todas as análises foram conduzidas utilizando-se o módulo GLZM do SPSS 17.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) com soma de quadrados do tipo III e adotada significância para $p < 0,05$.

RESULTADOS

Estado geral dos animais e sobrevida

Todos os animais sobreviveram durante o período de observação previamente definido. Os animais tratados com doxorubicina apresentaram atividade reduzida, piloereção, pelos com coloração amarelada, exsudação ao redor dos olhos e das narinas.

Fração de ejeção

A FEVE do grupo CDX após o tratamento apresentou valores menores em comparação ao grupo C, CEX e DXEX. No grupo CHT a FEVE também foi menor em comparação aos grupos C, CEX, DXEX e DXHT. Os resultados estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2: Fração de ejeção ventricular esquerda entre os grupos após a intervenção

Grupos	C	CEX	CHT	CDX	DXEX	DXHT	DXEXHT
FEVE (%)	77.33±5.36*+	76.66±5.23*+	58.33±3.84	62±1.52	77±7.57*+	75.33±2.33*	64.33±12.45

Os valores correspondem à média ± erro padrão. C-controle; CEX- exercício; CHT- hormônio tireoidiano; CDX-doxorubicina; DXEX-doxorubicina + exercício; DXHT-doxorubicina + hormônio tireoidiano; DXEXHT-doxorubicina + exercício + hormônio tireoidiano; FEVE- fração de ejeção do ventrículo esquerdo; A FEVE foi mensurada após 6 semanas da administração de doxorubicina. FEVE⁺ CHT x C, CEX, DXEX, DXHT⁺ CDX x C, CEX, DXEX; *+ indicam diferença estatisticamente significante com $p < 0,05$.

Tolerância ao esforço

Na avaliação da tolerância ao esforço, o tempo até a exaustão no grupo CEX foi maior quando comparado aos demais grupos experimentais. Achado importante do teste foi observado no grupo CDX que apresentou menor tolerância ao esforço quando comparado aos demais grupos, exceto em relação ao grupo controle. O CHT melhorou a tolerância ao esforço, tanto isoladamente quanto após a doxorubicina, embora de maneira menos intensa que o exercício físico. A associação do exercício físico com o hormônio tireoidiano não melhorou a tolerância ao esforço. Os resultados referentes ao teste de tolerância após tratamento estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Teste de tolerância entre os grupos após a intervenção

Grupos	C	CEX	CTH	CDX	DXEX	DXTH	DXEXTH
Tempo (min)	18.42±1.62 ^d	44.80±2,99 ^a	32.20±2.53 ^b	20.88±1.52 ^d	36.44±2.01 ^b	25.33±1.67 ^c	35±2.09 ^b

Os valores correspondem à média ± erro padrão. C-controle; CEX- exercício; CHT- hormônio tireoidiano; CDX-doxorubicina; DXEX-doxorubicina + exercício; DXHT-doxorubicina + hormônio tireoidiano; DXEXHT-doxorubicina + exercício + hormônio tireoidiano; Poison; Diferentes letras indicam diferença estatisticamente significante com $p < 0.05$.

DISCUSSÃO

A doxorubicina provoca cardiotoxicidade, de natureza cumulativa e dose-dependente (Doroshov et al, 1985) e as principais alterações morfológicas do miocárdio decorrentes do seu uso são descritas como degeneração vacuolar, desorganização ou perda de miofibrilas, fibrose intersticial, dilatação do retículo sarcoplasmático e lesão mitocondrial caracterizada por tumefação e rompimento de cristas mitocondriais (Singal et al, 2000; Singal e Iliskovic, 1998). Estas alterações reduzem a função de bomba cardíaca piorando a tolerância ao esforço e diminuindo a FEVE em graus variados e vinculados ao teor da toxicidade (Negrão et al, 1992).

A tolerância ao esforço (TE) é um indicador do estado funcional do aparelho cardiovascular. Ele traduz a dinâmica de distribuição da perfusão do sangue, particularmente no que diz respeito ao sistema muscular esquelético e de diversos fatores que o influenciam. Serve também de indicador do grau de congestão pulmonar (Doroshov et al, 1985) que implica na redução das trocas gasosas e, portanto, na piora do metabolismo tecidual sendo um importante indicador da gravidade da IC.

A baixa tolerância ao esforço e a qualidade de vida reduzida, são características de pacientes com câncer tratados com doxorubicina e esses efeitos colaterais

debilitantes são, em sua maior parte, atribuídos à cardiotoxicidade induzida por este agente quimioterápico.

No presente estudo relatamos, pela primeira vez, os efeitos decorrentes do treinamento físico e/ou do hormônio tireoidiano sobre a FEVE e a tolerância ao esforço em animais, utilizando protocolo iniciado duas semanas após a administração de doxorubicina.

O exercício físico provoca inúmeras alterações morfofuncionais que ocorrem tanto a nível central como periférico, minimizando a intolerância ao esforço e reduzindo a fadiga precoce (Roveda et al, 2003; Gonçalves et al, 2006). De forma similar, o hormônio tireoidiano é tido como um indutor de melhora da TE (Mourouzis et al, 2012) desde que não se atinja níveis séricos capazes de produzir toxicidade, como evidenciado nos casos de tireotoxicose (Maia et al, 2013). Diante destes fatos, a associação do exercício físico ao hormônio tireoidiano poderia, teoricamente, resultar em melhor tolerância ao esforço.

Os efeitos positivos do exercício físico têm demonstrado cardioproteção quando são aplicados antes do tratamento com a doxorubicina (Maia et al, 2017), mas não há registros na literatura, nos limites do nosso conhecimento, de estudos que tenham empregado o treinamento físico e/ou hormônio tireoidiano após um esquema de administração deste quimioterápico.

Foi observado que das duas intervenções realizadas, o exercício físico proporcionou melhores resultados no teste de tolerância ao esforço (grupo CEX - 59%). Em um nível imediatamente abaixo, o hormônio tireoidiano também melhorou os resultados obtidos no teste (grupo CHT - 43%), ambos em relação ao grupo C. No grupo CDX não houve mudança no padrão da TE. Utilizando-se os quatro grupos, C, CEX, CHT e CDX como controle, foi possível comparar os efeitos obtidos com a doxorubicina. O exercício físico melhorou a TE em 44% e 50% em comparação aos grupos CDX e C respectivamente.

A FEVE dos grupos que realizaram exercício físico (CEX e DXEX) também foi maior em comparação ao grupo CDX. Este resultado, juntamente com o da tolerância ao esforço, apresenta fortes indícios de que a prática de exercício físico após o uso de doxorubicina pode amenizar os danos causados por esta droga.

Desde 1978, McElroy e cols. demonstraram que a prática regular de exercícios físicos é capaz de conferir cardioproteção. Parece inegável que o treinamento físico

aeróbio proteja o coração, tanto por atenuação da morte celular e eventuais efeitos regenerativos, quanto por garantir melhor manutenção da função cardíaca. No entanto, o mecanismo pelo qual isso ocorre ainda é motivo de debate. Os principais aspectos envolvidos são o aumento na produção de proteínas de choque térmico (HSP) (Morán et al, 2005; Powers et al, 2001), aumento na capacidade antioxidativa cardíaca, associado à redução na produção espécies reativas de oxigênio (EROs) nas mitocôndrias dos cardiomiócitos (French et al, 2008; Yamashita et al, 1999; Farah et al, 2013; Frasier et al, 2013; Hamilton et al, 2001), melhora da perfusão tecidual e redução da apoptose (Calvert et al, 2013; French et al, 2008). Especificamente, esses resultados estão de acordo com os relatórios de que o treinamento físico com exercícios de curto prazo oferece proteção contra lesão cardíaca (Demirel et al, 2001; Hamilton et al, 2001; Kavazis et al, 2014; Kavazis et al 2010).

Os mesmos efeitos ocorreram, de forma menos pronunciada, com o tratamento com hormônio tireoidiano (18% e 26%) em comparação aos grupos CDX e C, respectivamente. Evidências mostram que os hormônios tireoidianos também atuam na tradução e produção proteica e sobre os processos de sinalização iniciados na membrana plasmática e no citoplasma, os quais resultam em respostas biológicas amplificadas (Davis e Davis 2002). A ação nuclear do hormônio tireoidiano aumenta a expressão das proteínas de cadeia pesada α (α MHC) e diminui a expressão das proteínas de cadeia pesada β (β MHC), o que provoca aumento da frequência cardíaca e da velocidade de contração. A sua ação não nuclear altera o comportamento dos canais iônicos de sódio, potássio e cálcio da membrana dos cardiomiócitos, fato que resulta em cronotropismo e inotropismo positivos (Klein e Ojama, 2001; Kahaly e Dillmann, 2005). Além da ação central nos mecanismos cardíacos, o hormônio tireoidiano também atua aumentando o volume sanguíneo circulante, e, portanto, a oxigenação tecidual, e reduz a resistência periférica. Talvez essas respostas diretas e indiretas provenientes da ação do hormônio estejam envolvidas, pelo menos em parte, na melhora da tolerância ao esforço.

A adição isolada do hormônio tireoidiano reduziu em 33% a FEVE em comparação ao grupo C. Isso não significa, obrigatoriamente, que o hormônio tireoidiano tenha piorado a função cardiovascular global pois pode ser que em decorrência das demais modificações hemodinâmicas, muitas já citadas, poderia estar caracterizada uma condição onde se obtém melhor resposta circulatória sistêmica mesmo com menor FEVE. Este fato pode estar comprovado pela melhora da resposta ao

teste de tolerância identificada com o hormônio tireoidiano. Mesmo sendo observado esta redução da FEVE no controle, o mesmo parece não ocorrer quando há a toxicidade da doxorrubicina. A mesma adição do hormônio em animais que receberam a doxorrubicina aumentou a FEVE. Este fato parece indicar que as modificações induzidas pelo hormônio tireoidiano, conforme já descritas, tem efeito numa situação em que a depressão da função cardíaca já está presente. A somatória deste efeito com os resultados da avaliação da tolerância ao esforço mostra uma possibilidade terapêutica adicional que poderia suprir uma eventual lacuna no processo de tratamento especialmente quando o paciente se encontra intolerante ao treinamento físico.

Adicionalmente, Khalife et al, (2005) demonstraram que o tratamento com hormônio tireoidiano restabeleceu o fluxo sanguíneo coronariano, preveniu a fibrose cardíaca e a perda de miócitos em modelo animal de cardiomiopatia dilatada. Todos estes aspectos estão geralmente relacionados a uma melhor função cardíaca.

Uma questão a ser considerada seria se a doxorrubicina poderia suprimir os efeitos favoráveis do treinamento físico sobre a tolerância ao esforço. Observando os resultados do grupo DXEX verifica-se que isso não ocorreu embora tenha havido atenuação da resposta da TE ao treinamento físico.

De acordo com Scott et al, (2010), o exercício aeróbio aplicado antes da doxorrubicina melhora a função sistólica e diastólica ventricular e atenua o remodelamento cardíaco patológico, resultando em uma melhor tolerância ao esforço em pacientes com IC induzida por antraciclinas.

Alguns autores demonstraram que o exercício físico regular realizado antes do uso da doxorrubicina atenua a perda da função do ventrículo esquerdo (Chicco et al, 2006; Wonders et al, 2008; Hydock et al, 2008), melhora a capacidade bioenergética mitocondrial e previne o dano oxidativo (Demirel et al, 1998; Marques-Aleixo et al, 2015) inibindo o aumento do sinal apoptótico (Chicco et al, 2006; Wonders et al, 2009) e preservando a expressão da cadeia pesada de miosina (Hydock et al, 2011).

Essa mesma comparação pode ser feita em relação ao tratamento com o hormônio tireoidiano. O grupo DXHT apresentou melhora da TE embora atingindo valores inferiores aos obtidos no grupo CEX.

Finalmente, o resultado obtido na associação do treinamento físico e do hormônio tireoidiano não mostrou benefícios em relação ao treinamento físico isoladamente em animais que receberam doxorrubicina. Diante dos resultados, a melhor

opção para atenuar os efeitos da cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina e a TE na presença de doxorubicina foi o exercício físico. No entanto, a opção pelo hormônio tireoidiano parece válida quando o exercício não puder ser utilizado. A ausência de mortalidade indica segurança, tanto com o treinamento físico quanto com o hormônio tireoidiano nas doses utilizadas e na presença da cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina, mesmo quando eles são associados.

É, ainda, necessário verificar se estas opções podem ser úteis em pacientes que, submetidos ao tratamento com doxorubicina, desenvolvem cardiotoxicidade e podem evoluir para insuficiência cardíaca.

LIMITAÇÕES DO ESTUDO

A principal limitação deste estudo está relacionada ao tempo curto do protocolo de exercício e ao hormônio tireoidiano (T4) escolhido. Para avaliar as respostas referentes à tolerância ao esforço nos grupos estudados sabe-se que os efeitos do treinamento físico podem acontecer em um prazo mais longo. Por sua vez, a transformação de T4 em T3 pode estar prejudicada devido à presença da doxorubicina e as ações desejadas do hormônio podem ter sido atenuadas. Deve-se também destacar que não foi feita a avaliação do consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}) dos animais, medida que poderia auxiliar na interpretação dos resultados.

CONCLUSÃO

Os resultados preliminares indicam que o treinamento com exercício físico regular e de baixa intensidade após o uso de doxorubicina melhorou a tolerância ao esforço dos animais. A adição do hormônio tireoidiano ao exercício físico não modificou o padrão de resposta obtida com o treinamento isoladamente mostrando, porém, não haver piora das condições físicas dos animais na presença do hormônio. Mais estudos são necessários com a finalidade de elucidar quais são os mecanismos envolvidos na toxicidade cardiovascular provocada pela doxorubicina que podem ser atenuados pelo treinamento físico e pelo hormônio tireoidiano e que repercutem negativamente na tolerância ao esforço físico e na função cardíaca.

Vinculação acadêmica

Este estudo é vinculado ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Faculdade de Medicina de Uberlândia, Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

REFERÊNCIAS

1. Francis, G. S. Pathophysiology of chronic heart failure. *The American Journal of Medicine*, 2001; 110(7), 37-46.
2. Katz, A. M., & Konstam, M. A. Heart failure: pathophysiology, molecular biology, and clinical management. Lippincott Williams & Wilkins. 2012.
3. Jessap, M., Brozena, S. 2007. Heart Failure. Review Article. *New England Journal Medicine*, 2012; 348, 2007 – 18.
4. Ho, K. K., Anderson, K. M., Kannel, W. B., Grossman, W., & Levy, D. Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects. *Circulation*, 1993; 88(1), 107-115.
5. Redfield, M. M., Kay, G. N., Jenkins, L. S., Mianulli, M., Jensen, D. N., Ellenbogen, K. A., & APT INVESTIGATORS. Tachycardia-related cardiomyopathy: a common cause of ventricular dysfunction in patients with atrial fibrillation referred for atrioventricular ablation. In *Mayo Clinic Proceedings*, 2000; Vol. 75, No. 8, pp. 790-795.
6. Cohn, J. N., Ziesche, S., Smith, R., Anand, I., Dunkman, W. B., Loeb, H., & Loss, L. Effect of the calcium antagonist felodipine as supplementary vasodilator therapy in patients with chronic heart failure treated with enalapril V-HeFT III. *Circulation*, 1997; 96(3), 856-863.
7. Schwarz, E. R., Pollick, C., Dow, J., Patterson, M., Birnbaum, Y., & Kloner, R. A. A small animal model of non-ischemic cardiomyopathy and its evaluation by transthoracic echocardiography. *Cardiovascular Research*, 1998; 39(1), 216-223.
8. Smith, R. D., Barrett, J. A., Wolf, P. S., & Pruss, T. P. The haemodynamic and myocardial contractile effects of celiprolol, atenolol and propranolol in mecamlamine-verapamil pretreated, anaesthetised dogs. *British Journal of Clinical Practice. Supplement*, 1985; 42, 35-43.
9. Dillmann, W. H. Cellular action of thyroid hormone on the heart. *Thyroid*, 2002; 12(6), 447-452.
10. Corssac G.B., de Castro A.L., Tavares A.V., Campos C., Fernandes R.O., Ortiz V.D., Siqueira R., Fernandes T.R., Belló-Klein A., Araujo A.S. Thyroid hormones effects on oxidative stress and cardiac remodeling in the right ventricle of infarcted rats. *Life Science*, 2016; 1(146)109-16.
11. Sullivan, M. J., & Hawthorne, M. H. Exercise intolerance in patients with chronic heart failure. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 1995; 38(1), 1-22.
12. Lu, K., Wang, L., Wang, C., Yang, Y., Hu, D., & Ding, R. Effects of high-intensity interval versus continuous moderate-intensity aerobic exercise on apoptosis, oxidative stress and metabolism of the infarcted myocardium in a rat model. *Molecular Medicine Reports*, 2015; 12(2), 2374-2382.
13. Golbidi, S., & Laher, I. Molecular mechanisms in exercise-induced cardioprotection. *Cardiology Research and Practice*, 2011.
14. Haykowsky, M. J., Kouba, E. J., Brubaker, P. H., Nicklas, B. J., Eggebeen, J., & Kitzman, D. W. Skeletal muscle composition and its relation to exercise intolerance in older patients with heart failure and preserved ejection fraction. *The American Journal of Cardiology*, 2014; 113(7), 1211-1216.

15. Campos, E.C., O'Connell, J. L., Malvestio, L. M, et al. Calpain-mediated dystrophin disruption may be a potential structural culprit behind chronic doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Cardiovascular Pharmacology*, 2011; 670 (2011) 541–553
16. Engelman, M. F., Guidugli Neto, J., Andrade, C. H., Hernandez, R., & Goulart, L. B. Estudo morfológico do fígado de ratos submetidos a doses supra-fisiológicas de tiroxina. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 2001; 45(2), 173-179.
17. Gobatto, C. A., De Mello, M. A. R., Sibuya, C. Y., De Azevedo, J. R. M., Dos Santos, L. A., & Kokubun, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2001; 130(1), 21-27.
18. Gobatto, C. A., Sibuya, C. Y., Azevedo, J. R. M., Luciano, E., Kokubun, E., & Mello, M. A. R. Characterization of exercise intensity and of physical training effects using a swimming model for Wistar rats. *Motriz*, 2001; 7(1), 57-62.
19. Harri, M., & Kuusela, P. Is swimming exercise or cold exposure for rats? *Acta Physiologica Scandinavica*, 1986; 126(2), 189-197.
20. Dawson, C. A., & Horvath, S. M. Swimming in small laboratory animals. *Medicine and Science in Sports*, 1970; 2(2), 51.
21. Doroshov, J. H., Tallent, C., & Schechter, J. E. Ultrastructural features of Adriamycin-induced skeletal and cardiac muscle toxicity. *The American Journal of Pathology*, 1985; 118(2), 288.
22. Singal, P., Li, T., Kumar, D., Danelisen, I., & Iliskovic, N. Adriamycin-induced heart failure: mechanisms and modulation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2000; 207(1-2), 77-86.
23. Singal, P. K., & Iliskovic, N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *New England Journal of Medicine*, 1998; 339(13), 900-905.
24. Negrao, C. E., Moreira, E. D., Santos, M. C., Farah, V. M., & Krieger, E. M. Vagal function impairment after exercise training. *Journal of Applied Physiology*, 1992; 72(5), 1749-1753.
25. Roveda, F., Middlekauff, H. R., Rondon, M. U. P., Reis, S. F., Souza, M., Nastari, L., & Negrão, C. E. The effects of exercise training on sympathetic neural activation in advanced heart failure: a randomized controlled trial. *Journal of the American College of Cardiology*, 2003; 42(5), 854-860.
26. Gonçalves, A., Resende, E. S., Fernandes, M. L. M. P., & Costa, A. M. D. Effect of thyroid hormones on cardiovascular and muscle systems and on exercise tolerance: a brief review. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 2006; 87(3), e45-e47.
27. Mourouzis, I., Mantzouratou, P., Galanopoulos, G., Kostakou, E., Roukounakis, N., Kokkinos, A. D., & Pantos, C. Dose-dependent effects of thyroid hormone on post-ischemic cardiac performance: potential involvement of Akt and ERK signalings. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2012; 363(1-2), 235-243.
28. Maia, A. L., Scheffel, R. S., Meyer, E. L. S., Mazeto, G. M., Carvalho, G. A. D., Graf, H., & Andrada, N. C. D. The Brazilian consensus for the diagnosis and treatment of hyperthyroidism: recommendations by the Thyroid Department of the Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 2013; 57(3), 205-232.

29. Maia, T. N., Araújo, G. B. R., Teixeira, J. A. C et al. Cardiotoxicidade decorrente do tratamento com doxorubicina e exercício físico: Revisão sistemática. *International Journal of Cardiovascular Science*. 2017;30(1):70-80.
30. McElroy, C. L., Gissen, S. A., & Fishbein, M. C. Exercise-induced reduction in myocardial infarct size after coronary artery occlusion in the rat. *Circulation*, 1978; 57(5), 958-962.
31. Morán, M., Blázquez, I., Saborido, A., & Megías, A. Antioxidants and ecto-5'-nucleotidase are not involved in the training-induced cardioprotection against ischaemia–reperfusion injury. *Experimental physiology*, 2005; 90(4), 507-517.
32. Powers, S. K., & Demirel, H. Exercise, heat shock proteins, and myocardial protection from IR injury. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 2001; 33(3), 386-392.
33. French, J. P., Hamilton, K. L., Quindry, J. C., Lee, Y., Upchurch, P. A., & Powers, S. K. Exercise-induced protection against myocardial apoptosis and necrosis: MnSOD, calcium-handling proteins, and calpain. *The FASEB Journal*, 2008; 22(8), 2862-2871.
34. Yamashita, N., Hoshida, S., Otsu, K., Asahi, M., Kuzuya, T., & Hori, M. Exercise provides direct biphasic cardioprotection via manganese superoxide dismutase activation. *Journal of Experimental Medicine*, 1999; 189(11), 1699-1706.
35. Farah, C., Kleindienst, A., Bolea, G., Meyer, G., Gayrard, S., Geny, B., ... & Reboul, C. Exercise-induced cardioprotection: a role for eNOS uncoupling and NO metabolites. *Basic research in cardiology*, 2013; 108(6), 1-13.
36. Frasier, C. R., Moukdar, F., Patel, H. D., Sloan, R. C., Stewart, L. M., Alleman, R. J., & Brown, D. A. Redox-dependent increases in glutathione reductase and exercise preconditioning: role of NADPH oxidase and mitochondria. *Cardiovascular research*, 2013; 98(1), 47-55.
37. Hamilton, K. L., Powers, S. K., Sugiura, T., Kim, S., Lennon, S., Tümer, N., & Mehta, J. L. Short-term exercise training can improve myocardial tolerance to I/R without elevation in heat shock proteins. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2001; 281(3), H1346-H1352.
38. Calvert, J. W., & Lefer, D. J. Role of β -adrenergic receptors and nitric oxide signaling in exercise-mediated cardioprotection. *Physiology*, 2013; 28(4), 216-224.
39. French, J. P., Hamilton, K. L., Quindry, J. C., Lee, Y., Upchurch, P. A., & Powers, S. K. Exercise-induced protection against myocardial apoptosis and necrosis: MnSOD, calcium-handling proteins, and calpain. *The FASEB Journal*, 2008; 22(8), 2862-2871.
40. Demirel, H. A. Powers, S. K., Zergeroglu, M. A., Shanely, R. A., Hamilton, K., Coombes, J., Naito, H. Short-term exercise improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *J Appl Physiol*, 2001; 91:2205–2212.
41. Kavazis, N. A., Smuder A. J., Powers S.K. Effects of short term endurance exercise training on acute doxorubicin-induced FOXO transcription in cardiac and skeletal muscle. *J Appl Physio*, 2014; 117:223–230.
42. Kavazis, N., Smuder, A. J., Min, K., Tümer, N., Powers, S. K. Short-term exercise training protects against doxorubicin-induced cardiac mitochondrial

- damage independent of HSP72. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010; 299:1515–1524.
43. Davis, P. J., & Davis, F. B. Nongenomic actions of thyroid hormone on the heart. *Thyroid*, 2002; 12(6), 459-466.
 44. Klein, I., & Ojamaa, K. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *New England Journal of Medicine*, 2001; 344(7), 501-509.
 45. Kahaly, G. J., & Dillmann, W. H. Thyroid hormone action in the heart. *Endocrine reviews*, 2005; 26(5), 704-728.
 46. Khalife, W. I., Tang, Y. D., Kuzman, J. A., Thomas, T. A., Anderson, B. E., Said, S., & Gerdes, A. M. Treatment of subclinical hypothyroidism reverses ischemia and prevents myocyte loss and progressive LV dysfunction in hamsters with dilated cardiomyopathy. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2005; 289(6), H2409-H2415.
 47. Scott, J. M., Koelwyn, G. J., Hornsby, W. E., Khouri, M., Peppercorn, J., Douglas, P. S., & Jones, L. W. Exercise therapy as treatment for cardiovascular and oncologic disease after a diagnosis of early-stage cancer. In *Seminars in oncology*, 2010; Vol. 40, No. 2, pp. 218-228.
 48. Chicco, A. J., Hydock, D. S., Schneider, C. M., & Hayward, R. Low-intensity exercise training during doxorubicin treatment protects against cardiotoxicity. *Journal of Applied Physiology*, 2006; 100(2), 519-527.
 49. Hydock, D. S., Lien, C. Y., Schneider, C. M., & Hayward, R. Exercise preconditioning protects against doxorubicin-induced cardiac dysfunction. *Medicine and science in sports and exercise*, 2008; 40(5), 808-817.
 50. Demirel, H. A., Powers, S. K., Caillaud, C., Coombes, J. S., Naito, H., Fletcher, L.A, Ji, L. L. Exercise training reduces myocardial lipid peroxidation following short-term ischemia-reperfusion. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 1998; 30(8), 1211-1216.
 51. Marques-Aleixo, I., Santos-Alves, E., Mariani, D., Rizo-Roca, D., Padrão, A. I., Rocha-Rodrigues, S., & Magalhães, J. Physical exercise prior and during treatment reduces sub-chronic doxorubicin-induced mitochondrial toxicity and oxidative stress. *Mitochondrion*, 2015; 20, 22-33.
 52. Wonders, K. Y., Hydock, D. S., Greufe, S., Schneider, C. M., & Hayward, R. Endurance exercise training preserves cardiac function in rats receiving doxorubicin and the HER-2 inhibitor GW2974. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 2009; 64(6), 1105-1113.
 53. Hydock, D. S., Lien, C. Y., Jensen, B. T., Schneider, C. M., & Hayward, R. Exercise preconditioning provides long-term protection against early chronic doxorubicin cardiotoxicity. *Integrative cancer therapies*, 2011; 10(1), 47-57.

Financing source

The present study was funded by CAPES and PIBIC / CNPq

Academic linkage

This study is linked to the Post-Graduate Program in Health Sciences - Uberlândia Medical School, Federal University of Uberlândia (UFU).

Author Contributions

Conceptualization: FR, EC, ES.

Data curation: FR, EC, ES.

Statistical analysis: CM

Funding acquisition: DL

Investigation: FR, DL, EC, ES

Methodology: FR, EC, ES

Project administration: ES

Resources: DL

Supervision: EC, ES

Validation: EC, ES

Visualization: EC, ES

Writing – original draft: FR, DL, EC, LR, ES

Writing – review & editing: FR, DL, EC, CM, LR, ES

O TREINAMENTO FÍSICO PRESERVA A ESTRUTURA E A FUNÇÃO CARDÍACAS DE RATOS APÓS TRATAMENTO COM DOXORRUBICINA.

Função cardíaca e doxorubicina.

Fernanda Rodrigues de Souza¹

Leandro Teixeira Paranhos Lopes¹

Érica Carolina Campos Pulici²

Clesnan Mendes Rodrigues³

Matheus Matioli Mantovani⁴

Alexandre Gonçalves⁵

Elmiro Santos Resende⁶

¹ Doutoranda em Ciências da Saúde – PGCS, Universidade Federal de Uberlândia - UFU, Uberlândia, MG, Brasil

² Faculdade de Educação Física, Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brasil

³ Hospital de Clínicas de Uberlândia, Instituto de Biologia, Estatística, UFU

⁴ Médico Veterinário e Residência em Clínica Médica (UFU)

⁵ Pós doutorando em Ciências da saúde - PGCS, Universidade Federal de Uberlândia - UFU, Uberlândia, MG, Brasil

⁶ Serviço de Cardiologia (Laboratório de Medicina Experimental), Hospital de Clínicas de Uberlândia, Universidade Federal de Uberlândia, MG, Brasil

Introdução: A doxorrubicina é um dos mais importantes agentes antitumorais. O principal fator limitante do uso desses agentes antineoplásicos é a cardiotoxicidade dose-dependente que pode propiciar o desenvolvimento de cardiomiopatia e insuficiência cardíaca. O exercício físico é um importante aliado neste contexto, pois proporciona melhora da função cardiovascular, tem efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, refletindo na melhora da capacidade funcional global e da qualidade de vida, principalmente em indivíduos com insuficiência cardíaca. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos no miocárdio e na função cardíaca do treinamento físico iniciado após o período de administração da doxorrubicina em ratos. **Material e métodos:** Foram utilizados 40 ratos Wistar machos, adultos, divididos aleatoriamente em quatro grupos identificados como: controle (C), exercício (EX), doxorrubicina (DX), doxorrubicina e exercício (DXEX). Os animais dos grupos DX e DXEX, receberam injeções intraperitoneais de cloridrato de doxorrubicina, três vezes/semana durante duas semanas, até atingir-se a dose cumulativa de 7,5mg/kg. Os grupos EX e DXEX participaram de um protocolo de natação com carga adicional de 5% do peso corporal. O treinamento foi conduzido ao longo de 4 quatro semanas com três sessões semanais de natação. Após período de tratamento, foram realizados o ecocardiograma e microscopia óptica convencional. Para analisar o comportamento das variáveis foram utilizados os Modelos Lineares Generalizados. **Resultados:** O peso do coração e a relação peso do coração/peso corporal (PCo/PC) foram maiores no grupo EX, em comparação aos grupos C, DX e DXEX. O grupo DX apresentou maior PCo/PC em comparação aos grupos C e DXEX. O grupo DXEX também apresentou maior PCo/PC em comparação ao grupo C. No grupo DXEX foram observadas células miocárdicas aumentadas em tamanho, sem infiltrados inflamatórios presentes no grupo DX. A fração de ejeção do grupo DX foi menor em comparação aos grupos C, EX e DXEX. A frequência cardíaca nos grupos EX e DX foi mais baixa do que a do grupo C.

Conclusão: O exercício físico aeróbio, iniciado após o tratamento com doxorrubicina, preserva a estrutura e a função cardíaca.

Palavras-chave: Estrutura cardíaca; função cardíaca; exercício físico; antraciclina

Introduction: Doxorubicin is one of the most important antitumoral agents. The main limiting factor for the use of these antineoplastic agents is its dose-dependent cardiotoxicity that may promote the development of cardiomyopathy and heart failure. Physical exercise is an important ally in this context, since it improves cardiovascular function, has anti-inflammatory and antioxidant effects, reflecting in the improvement of global functional capacity and quality of life, especially in individuals with heart failure. **Objective:** The aim of this study is to verify the effects of physical exercise on the cardiac structure and functional capacity of the myocardium of rats treated with doxorubicin. **Material and methods:** 40 adult male Wistar rats were randomly allocated to four groups: control (C), exercise (EX), doxorubicin (DX), doxorubicin and exercise (DXEX). DX and DXEX groups received intraperitoneal injections of doxorubicin hydrochloride, three times a week, for two weeks, until a cumulative dose of 7.5mg/kg was achieved. EX and DXEX groups participated in a swimming protocol with an additional load of 5% of body weight. The training was conducted over 4 weeks, with 3 weekly swimming sessions. After the treatment period, echocardiography and conventional light microscopy were performed. To analyze the behavior of the variables, the Generalized Linear Models were used. **Results:** Heart weight and body weight / body weight ratio (PCo / PC) were higher in the EX group compared to C, DX and DXEX groups. The DX group presented higher PCo / PC compared to groups C and DXEX. The DXEX group also had higher PCo / PC compared to group C. In the DXEX group, myocardial cells were increased in size, without inflammatory infiltrates that was presenting in the DX group. The ejection fraction of the DX group was lower in comparison to the C, EX and DXEX groups. The heart rate in the EX and DX groups was lower than in the C group. **Conclusion:** Aerobic physical exercise, initiated after treatment with doxorubicin, preserves cardiac structure and function.

Key words: Cardiac structure; cardiac function; physical exercise; anthracyclines

INTRODUÇÃO

A doxorubicina (DOX) é um antibiótico da classe das antraciclina, amplamente utilizado para tratar neoplasias. Contudo, o uso clínico da DOX é limitado pela sua cardiotoxicidade dose-dependente (SINGAL, 1998).

Dentre as intervenções visando minimizar a cardiotoxicidade induzida por DOX, o exercício tem sido extensivamente estudado como parte de um programa de monitorização terapêutica abrangente e é uma importante medida não farmacológica capaz de aumentar a tolerância ao tratamento, proporcionando proteção e mitigando alguns dos efeitos tóxicos desencadeados (LIEN, 2015). Os mecanismos pelos quais o exercício teria seus efeitos cardioprotetores ainda não estão claros. Contudo, sabe-se que ele modula positivamente vários importantes sistemas de defesa cardíaca que parecem antagonizar alguns efeitos tóxicos causados pelo tratamento com DOX (CHICCO, 2006; ASCENSÃO, 2012).

Alguns estudos demonstraram que o exercício físico realizado antes da administração de doxorubicina preserva a função mitocondrial, diminui a produção de espécies reativas de oxigênio, minimiza os danos oxidativos e a apoptose, preserva a isoforma alfa da cadeia pesada de miosina, aumenta a pressão sistólica final do ventrículo esquerdo e a relação dP/dt máxima e mínima (ASCENSÃO, 2005; WONDERS, 2008; HYDOCK, 2009).

No entanto, nenhum destes estudos avaliou os efeitos do treinamento físico realizado após administração de DOX. Torna-se, assim, necessário investigar se o treinamento físico pode preservar a estrutura e a capacidade funcional do coração, mesmo após a administração do quimioterápico. Destaca-se que o exercício é recomendado no tratamento de IC pela Diretriz Brasileira de Cardio-Oncologia da Sociedade Brasileira de Cardiologia (KALIL, 2011; HUNT, 2009) e nos Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults (PONIKOWSK, 2016).

O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos no miocárdio e na função cardíaca do treinamento físico iniciado após o período de administração da doxorubicina em ratos Wistar.

MATERIAL E MÉTODOS

Considerações gerais

Este protocolo foi aprovado pelo comitê de ética na utilização de animais da Universidade Federal de Uberlândia e todos os procedimentos seguiram em conformidade com Guia para Cuidado e Uso de Animais de Laboratório.

Foram utilizados 40 ratos da linhagem Wistar, machos, adultos, com peso inicial de aproximadamente 250 gramas, provenientes do laboratório de experimentação animal, onde foi desenvolvido o experimento. As condições ambientais para todos os grupos foram as mesmas, no que se refere à temperatura (25°), umidade relativa do ar, nível de ruído e luminosidade (ciclo claro/escuro 12h/12h). Os animais foram alimentados com ração e água “*ad libitum*”.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Administração de doxorrubicina

Os animais foram divididos em quatro grupos identificados como: controle (C), exercício (EX), doxorrubicina (DX), doxorrubicina e exercício (DXEX).

Os animais que pertenciam aos grupos DX e DXEX, receberam injeções intraperitoneais de cloridrato de doxorrubicina (Fauldoxo, Libbs Farmacêutica, Embú, São Paulo), três vezes por semana, ao longo de duas semanas, atingindo a dose cumulativa de 7,5 mg/kg (CAMPOS, 2011). Os grupos C e EX receberam volume de solução salina similar ao empregado para os animais tratados com doxorrubicina.

Protocolo de treinamento físico

O protocolo de treinamento físico foi iniciado após um intervalo de duas semanas do término das injeções de doxorrubicina.

Os grupos EX e DXEX realizaram o treinamento físico, como descrito abaixo:

Os animais passaram por um período inicial de adaptação sendo colocados em contato com água rasa à temperatura de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos, durante uma semana, cinco dias por semana (GOBATTO, 2001).

O exercício físico utilizado foi a natação, com carga adicional e cumulativa de 5% do peso corporal do animal. Para o treinamento foi utilizado um vidro com 250 mm diâmetro (HARRI & KUUSELA, 1986). A altura da coluna de água no vidro foi correspondente a 150% do comprimento corporal do rato. A temperatura da água foi

mantida entre 30°C e 34°C por ser considerada termicamente neutra em relação à temperatura corporal do rato (DAWSON, 1970; HUBRECHT,2010)

O treinamento físico foi conduzido durante quatro semanas, com três sessões semanais de natação. A referida carga adicional de trabalho consistiu de esferas de chumbo fixados em um colete preso na região anterior do tronco dos ratos. A carga foi reajustada semanalmente, conforme a variação do peso dos animais. A periodização do treinamento físico está demonstrada na Tabela 1.

Tabela1: Periodização do treinamento físico dos animais

Semanas de treinamento	Carga(%do peso corporal)	Dia/tempo (min)		
		Segunda-feira	quarta-feira	Sexta-feira
1	5%	10	15	15
2	5%	20	25	25
3	5%	30	35	35
4	5%	40	40	40

Ecocardiografia

Para obtenção das imagens ecocardiográficas, os animais foram anestesiados com associação de ketamina (Ketamina 10%, Agener União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP, Brasil, dose de 74 mg/kg) e xilazina (Dopaser, Laboratórios Calier, SA, Barcelona, Espanha, dose de 8 mg/kg) administrados por via intraperitoneal, permitindo ao animal manter a respiração espontânea durante o exame. Após anestesia, foi realizada a tricotomia da região anterior do tórax.

O ecocardiograma foi realizado utilizando-se o equipamento ESAOTE modelo *MyLab VET 30 Gold*, gerando imagens nos modos uni e bidimensional. Utilizou-se transdutor setorial com frequência de 8 Mhz, profundidade de 3,0 cm, e ângulo setorial de 75°. No modo M, ao corte transversal paraesternal direito no plano das cordoalhas tendíneas, foi mensurado o diâmetro do ventrículo esquerdo durante a diástole (DIVED) e sístole (DIVES) para posterior cálculo da fração de encurtamento (FS) pela fórmula $FS\% = [(DIVED - DIVES) / DIVED] \times 100$. No mesmo corte foram medidos os volumes diastólico (VVED) e sistólico (VVES), pelo método de Teicholz, para posterior cálculo da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE), pela fórmula $FEVE = [(VVED - VVES) / VVED] \times 100$.

Análise histopatológica

Ao final do tratamento os animais foram pesados e anestesiados com ketamina (Ketamina 10%, Agener União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP, Brasil, 80 mg/kg) e xilazina (Dopaser, Laboratórios Calier, S/A, Barcelona, Espanha, 8 mg/kg) administrados por via intraperitoneal, procedendo-se à abertura do tórax para a coleta do sangue por punção cardíaca direta e para a remoção do coração. Em seguida os corações foram lavados com solução de NaCl 0,9%, secos em papel filtro, pesados em balança de precisão e fixados em formol 10% tamponado.

Os corações foram cortados no plano longitudinal e fixados por imersão em formol tamponado a 10% por um período de 24 horas, desidratados em soluções crescentes de álcool, procesados e colocados blocos de parafina. Cada bloco foi cortado em secções de 5µm de espessura e, posteriormente, corados com hematoxilina e eosina para análise em microscópio óptico de luz.

ESTATÍSTICA

Para analisar o comportamento das variáveis peso corporal, relação do peso corporal/peso do coração, fração de encurtamento e fração de ejeção, os grupos de animais foram comparados entre si utilizando-se os Modelos Lineares Generalizados (MLG) com distribuição gaussiana. Para analisar a variável peso do coração também foi utilizado os MLG com distribuição de Gama. Para analisar a variável frequência cardíaca foram utilizados os MLG com distribuição de Poisson. Quando foram detectadas diferenças nos tratamentos, as médias foram comparadas par a par com o teste das diferenças mínimas significativas (LSD).

Todas as análises foram conduzidas utilizando-se o módulo GLzM do SPSS 17.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) com soma de quadrados do tipo III e adotado significância para $p < 0,05$.

RESULTADOS

Evolução do peso corporal e peso do coração

Os resultados referentes ao peso corporal, peso do coração e a relação do peso corporal/peso do coração dos animais após o tratamento estão demonstrados na Tabela 2. O peso do coração e a relação peso do coração/peso corporal foram maior no grupo EX, em comparação aos grupos C, DX e DXEX. O grupo DX apresentou valores

maiores da relação peso do coração/peso corporal, em comparação aos grupos C e DXEX. O grupo DXEX apresentou valores maiores da relação peso do coração/peso corporal, em comparação ao grupo C.

Tabela 2: Efeitos do exercício físico nos parâmetros corporais após a intervenção

Grupos	Peso corporal (g)	Peso do coração (g)	Relação PCo/PC (%)
C	347±10,80	0,90±0,08 ^b	0,25±0,37 ^d
EX	360±12,78	1,5±0,16 ^a	0,42±0,44 ^a
DX	336±9,53	0,95±0,07 ^b	0,28±0,33 ^b
DXEX	341±9,53	0,74±0,07 ^b	0,27±0,33 ^c

Os valores correspondem à média ± erro padrão. Para cada valor foram usados 10 animais. PC- peso corporal; PCo- peso do coração C-controle; EX- exercício; DX- doxorubicina; DXEX- doxorubicina + exercício. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante com $p < 0,05$.

Microscopia óptica convencional

A análise morfológica qualitativa do miocárdio dos animais no grupo C não evidenciou alterações patológicas. No miocárdio dos animais do grupo EX foram observadas células organizadas, sem lesão aparente e os cardiomiócitos com tamanho aumentado em relação aos do controle. No grupo DX foram observadas alterações morfológicas discretas, com poucas células apresentando degeneração vacuolar, presença de infiltrado de células inflamatórias, desorganização ou perda das miofibrilas e aumento do espaço intersticial. No grupo DXEX foram observadas células miocárdicas aumentadas em relação ao controle, sem presença de infiltrado de células inflamatórias e alguns focos de células com desorganização de miofibrilas (Figura 1).

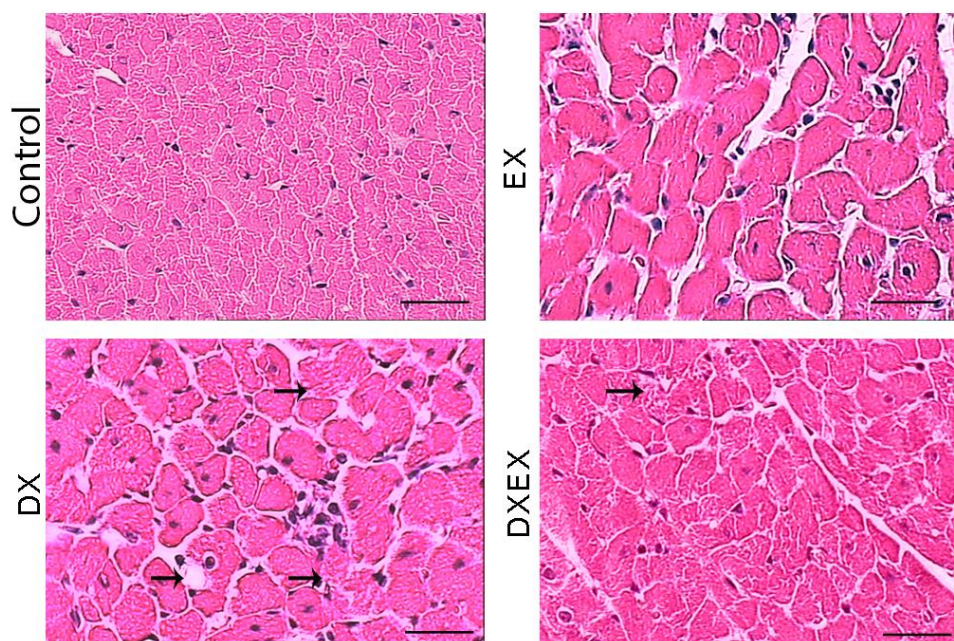


Figura 1: Microscopia óptica convencional dos animais controle, exercício (EX), doxorubicina (DX) e doxorubicina mais exercício (DXEX). Nota-se que o miocárdio dos animais tratados com doxorubicina apresenta infiltrado de células inflamatórias, degeneração vacuolar (seta) e desorganização ou perda de miofibrilas (seta). O miocárdio dos animais do grupo DXEX não apresentou infiltrados de células inflamatórias, porém existem alguns focos de células com desorganização de miofibrilas (seta). Coloração: hematoxilina e eosina. Barra = 50µm.

Ecocardiografia

A frequência cardíaca nos grupos EX e DX foi mais baixa em comparação ao grupo C. Apenas a frequência cardíaca do grupo EX foi mais baixa do que a do grupo DXEX.

A fração de ejeção do grupo DX após o tratamento foi menor em comparação ao grupo C, EX e DXEX. Os resultados estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3: Parâmetros ecocardiográficos entre os grupos após a intervenção

Grupo	FC (bpm)	DIVEd (mm)	DIVES (mm)	FS (%)	FEVE (%)
C	337±10,60	5,70±0,43	3,36±3,36	41,66±4,66	77,33±5,36
EX	280±9,67*	6,23±0,12	3,70±0,34	40,66±4,91	76,66±5,23
DX	298±9,96*	6,70±0,66	4,73±0,47	29,66±0,88	62,00±1,52*
DXEX	311,00±10,18 ⁺	6,06±0,56	3,56±0,68	42,00±7,37	77,00±7,57

Os valores correspondem à média ± erro padrão. C- controle; EX- exercício; DX- doxorubicina; DXEX- doxorubicina + exercício; FC- frequência cardíaca; DIVEd- diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; DIVES- diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; FS- fração de encurtamento; FEVE- fração de ejeção do ventrículo esquerdo; FC * C x EX e DX; + EX x DXEX; FEVE* DX x C, EX, DXEX. * + indicam diferença estatisticamente significativa, com p<0,05.

DISCUSSÃO

A doxorubicina provoca cardiotoxicidade de natureza cumulativa e dose-dependente (DOROSHOW, 1985; LIPSHULTZ, 2005; YEH & BICKFORD, 2009). No

presente estudo foram verificadas algumas características desta cardiotoxicidade em um modelo de ratos Wistar hígdos. Muitas alterações morfológicas cardíacas encontradas no presente estudo foram também descritas em humanos (STEINHERTZ et al., 1991) e em outros modelos experimentais animais (AROLA et al., 2000; TAKEMURA and FUJIWARA, 2007).

A doxorubicina produz efeitos sistêmicos que interferem em processos metabólicos orgânicos e são mais intensos quando maiores doses do medicamento são administradas. Estes efeitos podem ser avaliados pelas repercussões no ganho ponderal dos animais ao longo do experimento. Observou-se que na dose de 7,5mg/kg de doxorubicina não houve alterações significativas do peso corporal dos animais.

O peso do coração também foi analisado no presente estudo e o grupo EX apresentou valores maiores do que o controle, corroborando dados existentes que demonstram o efeito hipertrófico cardíaco em resposta ao treinamento físico regular. Quando foi calculada a relação do peso do coração/peso corporal do animal, o grupo EX também apresentou os maiores valores. Os grupos, DX e DXEX, também apresentaram aumentos discretos, porém significativos, da PCo/PC, em relação ao controle e podem estar relacionados a processos inflamatórios decorrentes da DOX.

No presente estudo, os animais do grupo DX apresentaram lesões características provocadas pela doxorubicina, como degeneração vacuolar, presença de infiltrado inflamatório, desorganização ou perda das miofibrilas e aumento do espaço intersticial. Estas lesões têm sido descritas na literatura e estão relacionadas à gravidade da cardiotoxicidade (SINGAL, 2000; CARVALHO, 2014).

A análise morfológica do miocárdio mostrou que o treinamento físico utilizado foi capaz de minimizar os danos provocados pela doxorubicina, com redução do processo inflamatório tecidual. Nos animais que participaram do protocolo de treinamento físico não foram observadas lesões de padrão inflamatório características e indicadoras da cardiotoxicidade. Foram encontrados apenas discretos focos de células com padrão de desorganização miofibrilar, o que pode sugerir que o exercício exerce um papel protetor cardíaco. Estas modificações dos achados inflamatórios e degenerativos ganham importância uma vez que eles são tidos como importantes componentes da fisiopatologia da insuficiência cardíaca, de uma maneira geral (RADAUCEANU, 2008).

Ao final do tratamento, o grupo DX apresentou uma redução acentuada da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (30%) confirmando a presença de

cardiotoxicidade com disfunção cardíaca. Alguns estudos mostram que a insuficiência cardíaca induzida por DOX é caracterizada por declínio da fração de ejeção do ventrículo esquerdo com menor tolerância ao esforço físico e pior prognóstico e aumento da morbidade e mortalidade (MACKEY, 2013). A função sistólica reduzida do ventrículo esquerdo no grupo DX interfere na função da bomba cardíaca em graus variados e está vinculada à intensidade da cardiotoxicidade (NEGRÃO, 1992). As alterações no diâmetro das câmaras cardíacas, observadas após tratamento com doxorubicina (grupo DX), são o resultado de uma série de fatores que podem incluir apoptose celular, hipertrofia celular compensatória, fibrose e sobreposição de filamentos contráteis alterados.

Os mecanismos envolvidos na toxicidade cardíaca provocada pelo uso da doxorubicina são multifatoriais e complexos, mas muitas dessas mudanças podem ser atribuídas à formação de radicais livres e à peroxidação lipídica de membranas celulares resultando em lesões ultraestruturais do coração (SINGAL, 2000; SCOTT, 2011; KOUZI, 2016). Em geral, o exercício físico atenua essas alterações, preserva a morfologia e está associado à melhora da função cardíaca (LIEN et al, 2015). Fortes evidências indicam que o exercício físico adiciona vantagens ao tratamento da insuficiência cardíaca, da doença arterial coronariana, da miocardiopatia dilatada, da hipertrofia do ventrículo esquerdo e pode ser visto, também, como parte de um programa global de reabilitação em pacientes oncológicos (THOMPSON, 2005; ASCENSÃO, 2005; CHICCO, 2006; McMULLEN, 2007).

Parece claro que o treinamento físico utilizado no presente modelo experimental modulou positivamente mecanismos fisiopatológicos e ativou alguns sistemas de defesa importantes para antagonizar os efeitos cardiotóxicos causados pela administração da DOX. O perfil inflamatório foi aparentemente modificado embora precise ser avaliado em novos estudos, com ênfase especial quanto ao comportamento do estresse oxidativo e os danos celulares e intersticiais a ele associados, uma vez que a cardiotoxicidade da DOX é classicamente atribuída a danos provocados pelo aumento das espécies reativas de oxigênio. Estes danos podem ter sido reduzidos em decorrência de efeito protetor do exercício físico contra a lesão induzida pelo estresse oxidativo e contra a peroxidação lipídica. De igual modo, o exercício desempenha um papel importante na minimização da sinalização apoptótica miocárdica que é também um fator associado à cardiotoxicidade induzida pela DOX (HYDOCK, 2009).

O presente estudo mostrou também que quatro semanas de treinamento aeróbio, além de manter a fração de ejeção do ventrículo esquerdo na presença de DOX, também reduziu a frequência cardíaca. Estudos demonstraram que ao se comparar a frequência cardíaca frente a uma mesma potência de trabalho, ela é menor no indivíduo treinado. Essa atenuação da frequência cardíaca em indivíduos treinados durante o exercício físico ocorre tanto em humanos quanto em animais e tem sido atribuída a maior estimulação vagal e a menor intensificação simpática (KENNEY, 1985; GALLO, 1989; NEGRÃO, 1991). Este comportamento modulador neuro-humoral do treinamento físico repercute favoravelmente na capacidade funcional dos indivíduos (BARBIER, J. et al, 2006). Finalmente, estudos epidemiológicos demonstram haver uma relação inversa entre a capacidade funcional e a morbidade e mortalidade cardiovasculares (LEE, 1995). Estes aspectos parecem comprovar os resultados encontrados no presente estudo.

CONCLUSÃO

O exercício físico aeróbio, iniciado após o tratamento com doxorubicina, preserva a estrutura e a função cardíaca. O estudo dos mecanismos envolvidos nesse efeito protetor do exercício físico pode proporcionar novas formas de compreensão e de abordagem na cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina.

REFERENCIAS

- 1- SINGAL, Pawan K.; ILISKOVIC, Natasha. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. **New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 13, p. 900-905, 1998.
- 2- LIEN, Chia-Ying et al. Short-term exercise training attenuates acute doxorubicin cardiotoxicity. **Journal of physiology and biochemistry**, v. 71, n. 4, p. 669-678, 2015.
- 3- CHICCO, Adam J.; SCHNEIDER, Carole M.; HAYWARD, Reid. Exercise training attenuates acute doxorubicin-induced cardiac dysfunction. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 47, n. 2, p. 182-189, 2006.
- 4- ASCENSÃO, António; OLIVEIRA, Paulo J.; MAGALHÃES, José. Exercise as a beneficial adjunct therapy during Doxorubicin treatment—Role of mitochondria in cardioprotection. **International journal of cardiology**, v. 156, n. 1, p. 4-10, 2012.
- 5- ASCENSÃO, António et al. Endurance training attenuates doxorubicin-induced cardiac oxidative damage in mice. **International journal of cardiology**, v. 100, n. 3, p. 451-460, 2005.
- 6- WONDERS, Karen Y. et al. Acute exercise protects against doxorubicin cardiotoxicity. **Integrative Cancer Therapies**, v. 7, n. 3, p. 147-154, 2008.

- 7- HYDOCK, David S. et al. Voluntary wheel running in rats receiving doxorubicin: effects on running activity and cardiac myosin heavy chain. **Anticancer Research**, v. 29, n. 11, p. 4401-4407, 2009.
- 8- KALIL FILHO, R. et al. I Diretriz Brasileira de cardio-oncologia da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 96, n. 2, p. 01-52, 2011.
- 9- HUNT, Sharon Ann et al. 2009 focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 guidelines for the diagnosis and management of heart failure in adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 53, n. 15, p. e1-e90, 2009.
- 10- PONIKOWSKI, Piotr et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. **European heart journal**, p. ehw128, 2015.
- 11- CAMPOS, Erica C. et al. Calpain-mediated dystrophin disruption may be a potential structural culprit behind chronic doxorubicin-induced cardiomyopathy. **European journal of pharmacology**, v. 670, n. 2, p. 541-553, 2011.
- 12- GOBATTO, C. A. et al. Characterization of exercise intensity and of physical training effects using a swimming model for Wistar rats. **Motriz**, v. 7, n. 1, p. 57-62, 2001.
- 13- HARRI, M.; KUUSELA, P. Is swimming exercise or cold exposure for rats?. **Acta physiologica scandinavica**, v. 126, n. 2, p. 189-197, 1986.
- 14- DAWSON, C. A.; HORVATH, STEVEN M. Swimming in small laboratory animals. **Medicine and science in sports**, v. 2, n. 2, p. 51-78, 1970.
- 15- HUBRECHT, Robert C.; KIRKWOOD, James (Ed.). **The UFAW handbook on the care and management of laboratory and other research animals**. John Wiley & Sons, 2010.
- 16- DOROSHOW, JAMES H.; TALLENT, CAROLYN; SCHECHTER, J. E. Ultrastructural features of Adriamycin-induced skeletal and cardiac muscle toxicity. **The American journal of pathology**, v. 118, n. 2, p. 288, 1985.
- 17- LIPSHULTZ, Steven E. et al. Chronic progressive cardiac dysfunction years after doxorubicin therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 12, p. 2629-2636, 2005.
- 18- YEH, Edward TH; BICKFORD, Courtney L. Cardiovascular complications of cancer therapy: incidence, pathogenesis, diagnosis, and management. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 53, n. 24, p. 2231-2247, 2009.
- 19- STEINHERZ, Laurel J. et al. Cardiac toxicity 4 to 20 years after completing anthracycline therapy. **Jama**, v. 266, n. 12, p. 1672-1677, 1991.
- 20- AROLA, Olli J. et al. Acute doxorubicin cardiotoxicity involves cardiomyocyte apoptosis. **Cancer research**, v. 60, n. 7, p. 1789-1792, 2000.
- 21- TAKEMURA, Genzou; FUJIWARA, Hisayoshi. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from the cardiotoxic mechanisms to management. **Progress in cardiovascular diseases**, v. 49, n. 5, p. 330-352, 2007.

- 22- RADAUCEANU, Anca et al. Extracellular matrix turnover and inflammatory markers independently predict functional status and outcome in chronic heart failure. **Journal of cardiac failure**, v. 14, n. 6, p. 467-474, 2008.
- 23- SINGAL, Pawan et al. Adriamycin-induced heart failure: mechanisms and modulation. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 207, n. 1, p. 77-86, 2000.
- 24- CARVALHO, Filipa S. et al. Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: From Bioenergetic Failure and Cell Death to Cardiomyopathy. **Medicinal research reviews**, v. 34, n. 1, p. 106-135, 2014.
- 25- NEGRAO, C. E. et al. Vagal function impairment after exercise training. **Journal of Applied Physiology**, v. 72, n. 5, p. 1749-1753, 1992.
- 26- LIEN, Chia-Ying et al. Short-term exercise training attenuates acute doxorubicin cardiotoxicity. **Journal of physiology and biochemistry**, v. 71, n. 4, p. 669-678, 2015.
- 27- SCOTT, Jessica M. et al. Modulation of anthracycline-induced cardiotoxicity by aerobic exercise in breast cancer. **Circulation**, v. 124, n. 5, p. 642-650, 2011.
- 28- KOUZI, Samir A.; UDDIN, Mohammad Nasir. Aerobic Exercise Training as a Potential Cardioprotective Strategy to Attenuate Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 19, n. 3, p. 399-410, 2016.
- 29- THOMPSON, Paul D. Exercise prescription and proscriptio for patients with coronary artery disease. **Circulation**, v. 112, n. 15, p. 2354-2363, 2005.
- 30- ASCENSÃO, António et al. Moderate endurance training prevents doxorubicin-induced in vivo mitochondriopathy and reduces the development of cardiac apoptosis. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 289, n. 2, p. H722-H731, 2005.
- 31- CHICCO, Adam J. et al. Low-intensity exercise training during doxorubicin treatment protects against cardiotoxicity. **Journal of Applied Physiology**, v. 100, n. 2, p. 519-527, 2006.
- 32- MCMULLEN, Julie R.; JENNINGS, Garry L. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, n. 4, p. 255-262, 2007.
- 33- MACKAY, John R. et al. Adjuvant docetaxel, doxorubicin, and cyclophosphamide in node-positive breast cancer: 10-year follow-up of the phase 3 randomised BCIRG 001 trial. **The Lancet Oncology**, v. 14, n. 1, p. 72-80, 2013.
- 34- KENNEY, W. Larry. Parasympathetic control of resting heart rate: relationship to aerobic power. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 17, n. 4, p. 451-455, 1985.
- 35- GALLO, Júnior L. et al. Sympathetic and parasympathetic changes in heart rate control during dynamic exercise induced by endurance training in man. **Brazilian journal of medical and biological research= Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas/Sociedade Brasileira de Biofisica...[et al.]**, v. 22, n. 5, p. 631-643, 1988.

- 36- NEGRAO, C. E. et al. Vagal and sympathetic control of heart rate during exercise by sedentary and exercise-trained rats. **Brazilian journal of medical and biological research= Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas/Sociedade Brasileira de Biofisica...[et al.]**, v. 25, n. 10, p. 1045-1052, 1991.
- 37- BARBIER, J. et al. Relationships between sports-specific characteristics of athlete's heart and maximal oxygen uptake. **European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation**, v. 13, n. 1, p. 115-121, 2006.
- 38- LEE, I.-Min; HSIEH, Chung-cheng; PAFFENBARGER, Ralph S. Exercise intensity and longevity in men: the Harvard Alumni Health Study. **Jama**, v. 273, n. 15, p. 1179-1184, 1995.

REFERENCIAS

- 1- CHATTERJEE, Kanu et al. Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology*, v. 115, n. 2, p. 155-162, 2010.
- 2- Siveski-Iliskovic, N. et al. Probucol protects against adriamycin cardiomyopathy without interfering with its antitumor effect. *Circulation*, v. 91, n. 1, p. 10-15, 1995.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.91.1.10>
PMid:7805190
- 3- ILISKOVIC, Natasha et al. Mechanisms of beneficial effects of probucol in adriamycin cardiomyopathy. *Molecular and cellular biochemistry*, v. 196, n. 1, p. 43-49, 1999.
- 4- SINGAL, Pawan et al. Adriamycin-induced heart failure: mechanisms and modulation. *Molecular and cellular biochemistry*, v. 207, n. 1, p. 77-86, 2000.
- 5- TALLARICO, Demetrio et al. Myocardial cytoprotection by trimetazidine against anthracycline-induced cardiotoxicity in anticancer chemotherapy. *Angiology*, v. 54, n. 2, p. 219-227, 2003.
- 6- STEINHERZ, Laurel J. et al. Cardiac toxicity 4 to 20 years after completing anthracycline therapy. *Jama*, v. 266, n. 12, p. 1672-1677, 1991.
<https://doi.org/10.1001/jama.1991.03470120074036>
PMid:1886191
- 7- KALIL FILHO, R. et al. I Diretriz Brasileira de cardio-oncologia da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 96, n. 2, p. 01-52, 2011.
- 8- ANJOS FERREIRA, Ana Lucia et al. Effect of Lycopene on Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: An Echocardiographic, Histological and Morphometrical Assessment. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, v. 101, n. 1, p. 16-24, 2007.
- 9- ASCENSÃO, António; OLIVEIRA, Paulo J.; MAGALHÃES, José. Exercise as a beneficial adjunct therapy during Doxorubicin treatment—Role of mitochondria in cardioprotection. *International journal of cardiology*, v. 156, n. 1, p. 4-10, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2011.05.060>
PMid:21636148
- 10- ROCHETTE, Luc et al. Anthracyclines/trastuzumab: new aspects of cardiotoxicity and molecular mechanisms. *Trends in pharmacological sciences*, v. 36, n. 6, p. 326-348, 2015.
- 11- ŠTĚRBA, Martin et al. Oxidative stress, redox signaling, and metal chelation in anthracycline cardiotoxicity and pharmacological cardioprotection. *Antioxidants & redox signaling*, v. 18, n. 8, p. 899-929, 2013.
- 12- CAMPOS, Erica C. et al. Calpain-mediated dystrophin disruption may be a potential

structural culprit behind chronic doxorubicin-induced cardiomyopathy. *European journal of pharmacology*, v. 670, n. 2, p. 541-553, 2011.

13- PECORARO, Michela et al. Doxorubicin-mediated cardiotoxicity: role of mitochondrial connexin 43. *Cardiovascular toxicology*, v. 15, n. 4, p. 366-376, 2015.

14- LU, Ping. Monitoring cardiac function in patients receiving doxorubicin. In: *Seminars in nuclear medicine*. WB Saunders, 2005. p. 197-201.
PMid:16093497

15- VOLKOVA, Maria; RUSSELL, Raymond. Anthracycline cardiotoxicity: prevalence, pathogenesis and treatment. *Current cardiology reviews*, v. 7, n. 4, p. 214-220, 2011.
PMid:22758622 PMCID:PMC3322439

16- TACAR, Oktay; SRIAMORNSAK, Pornsak; DASS, Crispin R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 65, n. 2, p. 157-170, 2013.
<https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2012.01567.x>
PMid:23278683

17- SALAZAR-MENDIGUCHÍA, Joel et al. Anthracycline-mediated cardiomyopathy: basic molecular knowledge for the cardiologist. *Arch Cardiol Mex*, v. 84, n. 3, p. 218-23, 2014.

18- ALBINI, Adriana et al. Cardiotoxicity of anticancer drugs: the need for cardio-oncology and cardio-oncological prevention. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 102, n. 1, p. 14-25, 2010.
<https://doi.org/10.1093/jnci/djp440>
PMid:20007921 PMCID:PMC2802286

19- EWER, Michael S.; LIPPMAN, Scott M. Type II chemotherapy-related cardiac dysfunction: time to recognize a new entity. *Journal of Clinical Oncology*, v. 23, n. 13, p. 2900-2902, 2005.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2005.05.827>
PMid:15860848

20- DOROSHOW, JAMES H.; TALLENT, CAROLYN; SCHECHTER, J. E. Ultrastructural features of Adriamycin-induced skeletal and cardiac muscle toxicity. *The American journal of pathology*, v. 118, n. 2, p. 288, 1985.
PMid:3970141 PMCID:PMC1887878

21- SINGAL, Pawan K.; ILISKOVIC, Natasha. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *New England Journal of Medicine*, v. 339, n. 13, p. 900-905, 1998.
<https://doi.org/10.1056/NEJM199809243391307>
PMid:9744975

22- Dillmann, W. H. Cellular action of thyroid hormone on the heart. *Thyroid*, v. 12, n. 6, p. 447-452, 2002.

<https://doi.org/10.1089/105072502760143809>

PMid:12165105

23- COHN, Jay N. et al. Effect of the calcium antagonist felodipine as supplementary vasodilator therapy in patients with chronic heart failure treated with enalapril. *Circulation*, v. 96, n. 3, p. 856-863, 1997.

<https://doi.org/10.1161/01.CIR.96.3.856>

PMid:9264493

24- SCHWARZ, Ernst R. et al. A small animal model of non-ischemic cardiomyopathy and its evaluation by transthoracic echocardiography. *Cardiovascular research*, v. 39, n. 1, p. 216-223, 1998.

25- O'CONNELL, João Lucas et al. Short-term and long-term models of doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats: A comparison of functional and histopathological changes. *Experimental and Toxicologic Pathology*, v. 69, n. 4, p. 213-219, 2017.

26- Smith, R. D. et al. The haemodynamic and myocardial contractile effects of celiprolol, atenolol and propranolol in mecamlamine-verapamil pretreated, anaesthetised dogs. *British journal of clinical practice. Supplement*, v. 42, p. 35-43, 1985.

27- BATLOUNI, Michel et al. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia para o diagnóstico e tratamento da insuficiência cardíaca: Aspectos relevantes na prática clínica. In: *Manual de Cardiologia: SOCESP*. Atheneu, 2000. p. 53-64.

28- Rossi NETO, João Manoel. A dimensão do problema da insuficiência cardíaca do Brasil e do mundo. *Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo*, p. 1-10, 2004.

PMCID:PMC2750476

29- BARRETTO, Antonio Carlos Pereira. et al. Insuficiência cardíaca em grande hospital terciário de São Paulo. *Arq Bras Cardiol*, v. 71, n. 1, p. 15-20, 1998.

30- BARRETTO, Antonio Carlos Pereira et al. Revisão das II Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia para o diagnóstico e tratamento da insuficiência cardíaca. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 79, p. 1-30, 2002.

PMCID:PMC3456376

31- NOGUEIRA, Patrícia Resende; RASSI, Salvador; CORRÊA, Krislainy de Sousa. Perfil epidemiológico, clínico e terapêutico da insuficiência cardíaca em hospital terciário. *Arq Bras Cardiol*, v. 95, n. 3, p. 392-8, 2010.

<https://doi.org/10.1590/S0066-782X2010005000102>

PMid:20949226

32- REDFIELD, Margaret M. et al. Tachycardia-related cardiomyopathy: a common cause of ventricular dysfunction in patients with atrial fibrillation referred for atrioventricular ablation. In: *Mayo Clinic Proceedings*. Elsevier, 2000. p. 790-795.

33- VILLELA, Cássio Quintão; RIBEIRO, José Ricardo Claudino. Utilização de exercícios resistidos em reabilitação cardíaca: uma revisão de literatura. *e-Scientia*, v. 2, n. 1, 2009.

34- KATZ, Arnold M.; KONSTAM, Marvin A. *Heart failure: pathophysiology, molecular biology, and clinical management*. Lippincott Williams & Wilkins, 2012.

35- RA, Almeida; RM, Rocha; RÉA-NETO, A. II Diretriz brasileira de insuficiência cardíaca aguda. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 93, n. 3, p. 2-65, 2009.

36- Seixas-Cambao, M.; Feite-Moreira, A. F. Fisiopatologia da insuficiência cardíaca crônica. *Revista portuguesa de cardiologia*, v. 28, n. 4, p. 439-471, 2009.
PMid:19634500

37- BARRETTO, Antônio Carlos Pereira; RAMIRES, José Antonio Franchini. Insuficiência cardíaca. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, v. 71, n. 4, p. 635-642, 1998.
PMid:10347943

38- SUTTON, Martin G. St John; SHARPE, Norman. Left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circulation*, v. 101, n. 25, p. 2981-2988, 2000.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.25.2981>
PMid:10869273

39- EICHHORN, Eric J.; BRISTOW, Michael R. Medical therapy can improve the biological properties of the chronically failing heart. *Circulation*, v. 94, n. 9, p. 2285-2296, 1996.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.94.9.2285>
PMid:8901684

40- FERRAZ, Almir Sérgio; YAZBEL-JUNIOR, P. Prescrição do exercício físico para pacientes com insuficiência cardíaca. *Rev Soc Cardiol RS*, v. 15, p. 1-13, 2006.

41- MANN, Douglas L. et al. *Braunwald's heart disease: a textbook of cardiovascular medicine*. Elsevier Health Sciences, 2014.

42- FERNANDES, Rafael Oliveira. Hipertrofia cardíaca induzida pelo hipertireoidismo experimental: papel do estado redox sobre proteínas envolvidas em vias de sinalização intracelular para crescimento, sobrevivência e morte celular. 2010.

43- MULLER, A. F. et al. *Thyroid function disorders--Guidelines of the Netherlands Association of Internal Medicine*. 2008.

44- GONÇALVES, Alexandre. et al. Influência dos hormônios tireoidianos sobre o sistema cardiovascular, sistema muscular e a tolerância ao esforço: uma breve revisão. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 87, n. 3, 2006.

- 45- Hsu, R. B. et al. Effect of triiodothyronine administration in experimental myocardial injury. *Journal of endocrinological investigation*, v. 18, n. 9, p. 702-709, 1995.
<https://doi.org/10.1007/BF03349792>
PMid:8719301
- 46- KLEMPERER, John D. et al. Triiodothyronine improves left ventricular function without oxygen wasting effects after global hypothermic ischemia. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, v. 109, n. 3, p. 457-465, 1995.
[https://doi.org/10.1016/S0022-5223\(95\)70276-8](https://doi.org/10.1016/S0022-5223(95)70276-8)
- 47- Kountz, W. B. Vascular degeneration in hypothyroidism. *AMA archives of pathology*, v. 50, n. 6, p. 765, 1950.
PMid:14789321
- 48- BARNES, Brodao. Prophylaxis of ischaemic heart-disease by thyroid therapy. *The Lancet*, v. 274, n. 7095, p. 149-152, 1959.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(59\)90561-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(59)90561-6)
- 49- MARTINEZ, Felipe. Thyroid hormones and heart failure. *Heart failure reviews*, v. 21, n. 4, p. 361-364, 2016.
<https://doi.org/10.1007/s10741-016-9556-5>
PMid:27098905
- 50- RAJAGOPALAN, Viswanathan; GERDES, A. Martin. Role of thyroid hormones in ventricular remodeling. *Current heart failure reports*, v. 12, n. 2, p. 141-149, 2015.
<https://doi.org/10.1007/s11897-014-0246-0>
PMid:25492377
- 51- KHALIFE, Wissam I. et al. Treatment of subclinical hypothyroidism reverses ischemia and prevents myocyte loss and progressive LV dysfunction in hamsters with dilated cardiomyopathy. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 289, n. 6, p. H2409-H2415, 2005.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00483.2005>
PMid:16024568
- 52- EVERTS, MARIA E. et al. Uptake of thyroid hormones in neonatal rat cardiac myocytes. *Endocrinology*, v. 137, n. 10, p. 4235-4242, 1996.
- 53- BRENT, Gregory A. The molecular basis of thyroid hormone action. *New England Journal of Medicine*, v. 331, n. 13, p. 847-853, 1994.
<https://doi.org/10.1056/NEJM199409293311306>
PMid:8078532
- 54- OJAMAA, Kaie; KLEMPERER, John D.; KLEIN, Irwin. Acute effects of thyroid hormone on vascular smooth muscle. *Thyroid*, v. 6, n. 5, p. 505-512, 1996.
<https://doi.org/10.1089/thy.1996.6.505>
PMid:8936680

55- CHEN, Yue-Feng et al. Improvement of left ventricular remodeling after myocardial infarction with eight weeks L-thyroxine treatment in rats. *Journal of translational medicine*, v. 11, n. 1, p. 40, 2013.

<https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-40>

PMid:23409791 PMCID:PMC3576349

56- ROFFI, Marco; CATTANEO, Fabio; TOPOL, Eric J. Thyrotoxicosis and the cardiovascular system: subtle but serious effects. *Cleveland Clinic journal of medicine*, v. 70, n. 1, p. 57-63, 2003.

<https://doi.org/10.3949/ccjm.70.1.57>

PMid:12549727

57- Venditti, P.; Di Meo, S. Thyroid hormone-induced oxidative stress. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, v. 63, n. 4, p. 414-434, 2006.

<https://doi.org/10.1007/s00018-005-5457-9>

PMid:16389448

58- BARATA, Temudo (Ed.). *Atividade física e medicina moderna*. 1997.

59- FAGARD, Robert. Athlete's heart. *Heart*, v. 89, n. 12, p. 1455-1461, 2003.

<https://doi.org/10.1136/heart.89.12.1455>

PMid:14617564 PMCID:PMC1767992

60- HAYKOWSKY, Mark J. et al. Skeletal muscle composition and its relation to exercise intolerance in older patients with heart failure and preserved ejection fraction. *The American journal of cardiology*, v. 113, n. 7, p. 1211-1216, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2013.12.031>

PMid:24507172 PMCID:PMC4282135

61- Negrao, C. E. et al. Vagal function impairment after exercise training. *Journal of Applied Physiology*, v. 72, n. 5, p. 1749-1753, 1992.

PMid:1601782

62- Kalil, LMP. *Treinamento físico e frequência cardíaca de repouso em ratos idosos: avaliação da frequência cardíaca intrínseca e da modulação autonômica*. São Paulo, 1997. 76p. 1997. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado)-Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo.

63- MEDEIROS, Alessandra et al. Efeito do treinamento físico com natação sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos. *Revista Paulista de Educação Física*, v. 14, n. 1, p. 7-15, 2000.

64- FREYSSIN, Céline et al. Cardiac rehabilitation in chronic heart failure: effect of an 8-week, high-intensity interval training versus continuous training. *Archives of physical medicine and rehabilitation*, v. 93, n. 8, p. 1359-1364, 2012.

- 65- BARBIER, Julie et al. Relationships between sports-specific characteristics of athlete's heart and maximal oxygen uptake. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation*, v. 13, n. 1, p. 115-121, 2006.
PMid:16449874
- 66- CARREÑO, Juan Eduardo et al. Cardiac hypertrophy: molecular and cellular events. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*, v. 59, n. 5, p. 473-486, 2006.
- 67- KATCH, Frank I.; KATCH, Víctor; MCARDLE, W. D. *Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano*. Rio de Janeiro: Koogan, 1991.
- 68- MAGALHÃES, Flávio Castro et al. Hipertrofia cardíaca induzida pelo treinamento físico: eventos moleculares e celulares que modificam o fenótipo. *Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte*, v. 7, n. 1, 2008.
- 69- STEDING, Katarina et al. Relation between cardiac dimensions and peak oxygen uptake. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance*, v. 12, n. 1, p. 8, 2010.
<https://doi.org/10.1186/1532-429X-12-8>
PMid:20122149 PMCid:PMC2825210
- 70- MORGANROTH, Joel et al. Comparative left ventricular dimensions in trained athletes. *Ann Intern Med*, v. 82, n. 4, p. 521-524, 1975.
- 71- SOUZA, Fernanda Rodrigues de et al. Resposta Hipertrofica da Associação de Hormônio Tireoideano e de Exercício Físico no Coração de Ratos. *Arq. bras. cardiol*, v. 102, n. 2, p. 187-191, 2014.
- 72- ENGELMAN, Míriam FB et al. Estudo morfométrico do fígado de ratos submetidos a doses supra-fisiológicas de tiroxina. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 45, n. 2, p. 173-179, 2001.
- 73- GOBATTO, Claudio Alexandre et al. Characterization of exercise intensity and of physical training effects using a swimming model for Wistar rats. *Motriz*, v. 7, n. 1, p. 57-62, 2001.
- 74- GOBATTO, Claudio Alexandre et al. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, v. 130, n. 1, p. 21-27, 2001.
[https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(01\)00362-2](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(01)00362-2)
- 75- HARRI, M.; KUUSELA, P. Is swimming exercise or cold exposure for rats?. *Acta Physiologica*, v. 126, n. 2, p. 189-197, 1986
<https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1986.tb07805.x>
- 76- Dawson, C. A.; HORVATH, Steven M. Swimming in small laboratory animals. *Medicine and Science in Sports*, v. 2, n. 2, p. 51-78, 1970.

PMid:4939286

APÊNDICE A – Publicação

Journal of Respiratory and CardioVascular Physical Therapy

LITERATURE REVIEW

CARDIOTOXICITY OF CHEMOTHERAPY DRUGS AND POSSIBLE PROTECTIVE EFFECTS OF PHYSICAL EXERCISE: A LITERATURE REVIEW

THALYTA ROCHA COSTA¹, NAYARA YAMADA TAMBURÚS², FERNANDA RODRIGUES DE SOUZA³, MARA RÚBIA NUNES CELES⁴, ERICA C. CAMPOS PULICI²

¹Fisioterapeuta graduada na Faculdade de Educação Física – Curso de Fisioterapia (FAEFI), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais - MG, Brasil

²Professora da Disciplina de Fisioterapia Cardiovascular da Faculdade de Educação Física – Curso de Fisioterapia (FAEFI), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais - MG, Brasil

³Educadora Física, Doutoranda do Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais - MG, Brasil

⁴Professora Adjunta do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – IPTSP, Universidade Federal de Goiás – UFG, Goiânia – GO, Brasil

Received March 3, 2016; accepted November 20, 2016

KEYWORDS:
Cardiotoxicity,
doxorubicin,
anthracyclines,
cardiomyopathie,
exercise

This review was designed to summarize the main pathophysiological mechanisms of doxorubicin cardiotoxicity and the positive effects of physical exercise. **Objective:** To characterize a literature review on the main cardiotoxicity mechanisms already described and what possible strategies attenuate and/or prevent these side effects, with a focus on physical exercise. **Methods:** A literature search using PubMed (MEDLINE) and SciELO databases was conducted covering the articles published between 2000 and 2015. These studies were selected for posterior analysis, according to pre-established criteria. **Results:** Fifty-eight (58) articles based on references and according to the descriptors were found and 45 articles were included: 18 reviews, 19 articles developed with animal experiments, 07 articles with studies in humans and 01 guideline. **Conclusion:** Data analysis led us to understand that although there is no consensus about the doxorubicin mechanism of action that causes toxicity, the generation of reactive oxygen species and changes in intracellular calcium are the most studied mechanisms and provide the most evidence in literature. Other studies are still needed to elucidate the complex cardiotoxicity mechanisms and which strategies would be the best for cardioprotection. A possible therapeutic strategy that has been studied is implementing exercise, but some questions still arise, including: 1) What would be the best time to implement an exercise program, before or during chemotherapy? And 2) Could exercise play a cardioprotective role in preventing or attenuating toxic effects on the heart?

Corresponding Author

Erica Carolina Campos Pulici (ericacarol@gmail.com)

INTRODUCTON

Cancer causes more than 500 deaths annually in the United States, which corresponds to almost a quarter of all deaths¹. It is estimated that there are 10 million cancer survivors in the US and Europe, and the risk of cardiovascular death in this population can be greater than the risk of tumor recurrence². In Brazil, the estimate for the years 2014 and 2015 points to the occurrence of approximately 576,000 new cases, thus enhancing the magnitude of this problem in the country³.

Over the past decades, cancer treatment has substantially evolved due to the development of more potent drug therapies that improve prognosis^{2,4,5}. However, the discovery of such new agents has also resulted in the appearance of adverse effects, and the manifestation of cardiotoxicity has been a major limitation in their use².

A class of anthracycline drugs has become one of the most important strategies for the treatment of hematological and solid tumors⁶. In the class of anthracyclines, doxorubicin (DOX) is the main anti-tumor agent^{7,8} with wide application across the clinical spectrum^{9,10}, but its use is limited due to causing dose-dependent cardiotoxicity which may eventually lead to heart failure and increase the risk of death¹¹⁻¹³.

Despite pharmacological interventions minimizing DOX induced cardiotoxicity, exercise has been extensively studied as part of a comprehensive monitoring program in these patients. According to the authors, exercise is an important non-pharmacological measure able to increase DOX cardiotoxicity tolerance, providing parallel protection and mitigating some of its toxic effects¹⁴. The mechanisms by which exercise demonstrates its cardioprotective effects are still not clear; however, it is known that it positively modulates several important cardiac defense systems that appear to antagonize some toxic effects caused by DOX treatment¹⁵⁻¹⁶.

Given that the molecular mechanisms involved in cardiotoxicity induced by DOX are still poorly understood in literature, in addition to the cardioprotective effects of exercise in this condition, this critical review aims to summarize the main mechanisms involved in cardiotoxicity induced by DOX and highlight which cardioprotective strategies have been proposed to minimize these effects on the heart, with emphasis on the effects of physical exercise.

METHODS

This study used the PubMed (MEDLINE) and SciELO databases combining the descriptors in Health Sciences in English of *cardiotoxicity*, *doxorubicin*, *anthracyclines*, *cardiac alterations*, and *exercise*. The searches were conducted by restricting the date for articles published to between 2000 and 2015; it included review articles and studies in humans and in experimental animals which only addressed chemotherapy doxorubicin as a cause of cardiotoxicity, and those that described cardiotoxicity mechanisms and cardioprotective strategies, with an emphasis on the role of physical exercise. Articles outside the scope of interest or studies that addressed other types of chemotherapy regimens were excluded.

RESULTS

Based on the references found and according to the descriptors used in the search strategy, 58 articles were located and of these, 45 articles were included, being 18 reviews, 19 articles developed with animal testing, 07 articles of studies involving humans and 01 guideline. Below are the main points related to the discovery of the anthracyclines, the mechanisms of cardiotoxicity by doxorubicin, and current strategies proposed to attenuate and/or prevent its toxic effects, highlighting the role played by exercise.

Anthracyclines: In 1950, daunorubicin was identified from *Streptomyces peucetius* bacteria, giving rise to the anthracycline drug class¹⁷. Within this group, the two most prescribed forms in practice are doxorubicin (DOX) and daunorubicin. Its anti-tumor effects include interleaving into cellular DNA leading to inhibition of macromolecular biosynthesis, the generation of reactive oxygen species (ROS) and irreversible damage to DNA by inhibiting topoisomerase II¹⁸.

Secondary cardiotoxicity continues to be a limiting factor in their use being generally related to dose-response and mainly manifested as heart failure¹⁹. The National Cancer Institute defines cardiotoxicity in simple terms as "toxicity that affects the heart." According to the First Brazilian guidelines on cardio-oncology (*I Diretriz de Cardioncologia*), cardiotoxicity is defined according to changes in the left ventricular ejection fraction (LVEF) obtained by echocardiography, namely: Grade I:

asymptomatic decrease in LVEF between 10% and 20%; Grade II: LVEF decrease below 20% or below normal; and Grade III: symptomatic heart failure²⁰.

Cardiotoxicity can be manifested in three forms: acute, subacute or chronic. The acute or subacute form is characterized by changes occurring in ventricular repolarization, electrocardiographic abnormalities of QT interval arrhythmias, acute coronary syndromes, pericarditis and/or myocarditis, observed since the beginning of therapy until 2 weeks after completion of treatment²¹.

The most common manifestation of chronic cardiotoxicity is the systolic and/or diastolic ventricular dysfunction which leads to congestive heart failure and can lead to death^{21,22}. Regarding morphological changes of the myocardium resulting from the use of DOX, the following classic findings are described: vacuolar degeneration, disruption or loss of myofibrils, interstitial fibrosis, dilation of the sarcoplasmic reticulum²³ and T-tubules, mitochondrial lesion characterized by swelling and disruption of mitochondrial crests, and disorganization of nuclear chromatin impairing adhesion proteins²⁴.

In general, the main proposed cardiotoxicity mechanisms are: increased oxidative stress^{25,26} due to increased ROS levels^{23,27}, changes in sarcolemmal transport of calcium (Ca^{+2})^{16,25,28}, reduction in the expression of important cardiac structural proteins such as dystrophin and contractile proteins^{29,30}, cardiomyocyte apoptosis^{8,17,25,31}, changes in the sarcomeric structure, changes in the high energy phosphate complex and iron metabolism¹⁹, and the influence of age and gender³²⁻³⁵.

Influence of age and gender: The probability of developing cardiotoxicity may also occur at lower doses, probably due to individual susceptibility³². Some risk factors have been suggested to explain this susceptibility, such as gender difference and age³³. In the review by Puma et al., women had more severe cardiotoxicity evidenced by the loss of cardiac contractility, and they also had a higher risk in subclinical cardiotoxicity when compared to males³⁴. Older adult patients over 65 years and children under the age of four³³ have an increased risk of doxorubicin-induced cardiotoxicity³⁵.

Oxidative stress: The production of free radicals is one of the main mechanisms described in cardiac injury induced

by DOX. From the study by Chatterjee et al., DOX induces damage to mitochondria in cardiomyocytes and increases the production of enzymes such as NADH dehydrogenase, cytochrome P450 reductase and xanthine oxidase which are involved in generating free radicals and ROS. DOX increases the formation of superoxide anion, endothelial nitric oxide synthase (eNOS), and it induces intracellular hydrogen peroxide formation that leads to cell membrane damage and increased permeability⁷. A study by Salazar-Mendiguchía et al.¹⁹ described that myocardium is highly prone to oxidative damage due to its low levels of superoxide enzyme activity compared to other tissues. As the metabolism of anthracyclines involves reducing the quinone fraction of its semiquinone formula, the rapid transfer of its unpaired electron to an oxygen molecule may occur, returning to its original quinone form, and thus completing the redox cycle and inducing the formation of ROS¹⁹.

Intracellular Ca^{2+} : DOX-induced cardiotoxicity is also accompanied by an increase in intracellular Ca^{2+} levels. Dysregulation in the intracellular Ca^{2+} concentration can be the final route or cause for the increased generation of ROS. The generated ROS and hydrogen peroxide alter the normal Ca^{2+} homeostasis by inhibiting the Ca^{2+} ATPase pump. DOX induces Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum, increasing the likelihood that the channel becomes more permeable^{16,28}.

Deregulation of Ca^{2+} plays an important role in the pathogenesis of cardiomyopathy induced by DOX through the activation of proteases such as calpains. As a large part of the intracellular calcium of cardiomyocytes is in the sarcoplasmic reticulum, oxidative stress may result in leakage of Ca^{2+} , the activation of calpain and also of caspase-12, cleaving intracellular proteins and activating the apoptosis process. Furthermore, this increase in cytoplasmic Ca^{2+} concentration in DOX-induced injury is associated with deterioration and degradation of myofibrillar titin, which is a major protein and key component of the cardiac sarcomere. Inhibition, or perhaps more accurately, the prevention of calpain activity could help to maintain these structures as contractile and functioning³².

Structural integrity of cardiomyocytes: An experimental study in mice developed by Campos et al. in 2012 described

the importance of structural proteins present in cardiomyocytes in the occurrence of heart failure after treatment with DOX²⁹. Dystrophin is a key component of the dystrophin-glycoprotein complex that links the cytoskeleton and the extracellular matrix and is important for contraction and maintenance of sarcolemma and myofiber integrity³⁶⁻³⁸. It is suggested as a common route for inducing cardiomyopathy and heart failure³⁹⁻⁴¹, and led the authors to investigate the hypothesis that DOX could affect dystrophin expression and its associated proteins in rat hearts. This study provides new data that assisted in clarifying the molecular events involved in the cardiotoxicity caused by DOX. The treatment caused a sharp reduction/loss of dystrophin and of β -dystroglycan in cardiomyocytes and left ventricular dysfunction, which may constitute in combination with the loss of actin and myosin proteins, the structural basis of heart failure induced by DOX. Moreover, increased sarcolemmal permeability demonstrated by an increase in intracellular albumin suggests functional impairment of dystrophin and glycoproteins in cardiomyocytes treated with DOX. Another important finding was the significant increase in calpain expression. Treatment with dantrolene (a sarcoplasmic reticulum ryanodine receptor blocker) significantly improved survival rates and preserved the dystrophin and left ventricular function²⁹.

Recently, mitochondrial connexin (mCx43) has been indicated as a new regulator of mitochondrial function³⁰. MCx43 is the main protein forming the gap junction in adult cardiomyocytes and appears to prevent mitochondrial calcium increase induced by DOX, preventing the formation of transitional pores, decreasing depolarization time and the release of apoptogenic mitochondrial content³⁰.

Changes in sarcomeric structure: Cardiotoxicity induced by anthracyclines also occurs at the level of sarcomeric structures, primarily characterized by the breakdown and loss of myofilaments and sarcomere anchoring proteins. A study by Rochette et al. demonstrated that the anthracyclines are capable of modifying the structure of the contractile apparatus by direct mechanisms, or even from the cytotoxic effects mediated by ROS²⁵. The rapid degradation of titin through proteolytic pathways plays an important role in the pathophysiology of dilated

cardiomyopathy, with consequent functional impairment of the cardiac cell. In vitro and in vivo studies have shown that this effect is also related to the loss of structural integrity and disorder, and even myocyte necrosis of a calpain-dependent substance^{26,29,42}. Another study described the role of cardiac ankyrin repeat protein (CARP or ANKRD1, a regulatory protein of transcription that acts as a nuclear transcription factor that negatively regulates the expression of cardiac genes) in the pathophysiology of cardiomyopathy induced by anthracyclines. CARP is sensitive to DOX, leading to depletion of its levels by inhibiting its transcription, with consequent sarcomeric disorder⁴³.

Changes in the set of high energy phosphates: Mitochondrial damage impairs the ability to generate ATP; this depletion decreases the affinity of Hsp90 (90kDa heat shock protein, which appears to have a central role in the pathology of many types of cancer) for ErbB2 (Tyrosine kinase 2 receptor - oncogene), a cardioprotective protein that is upregulated in the myocardium. In conditions where ATPs can be depleted, ErbB2 levels fall as Hsp90 cannot maintain its affinity⁴⁴. Decreased levels of ATP can also originate from the activation of apoptotic pathways and of calcium-dependent proteases. Energy costs to replace damaged proteins can be considerable, especially if these proteins have high molecular weight such as in titin and dystrophin, which is degraded by indiscriminately activated calpain³².

Iron Metabolism (Fe): It has been considered that anthracyclines are able to alter iron homeostasis by creating iron-anthracycline complexes and subsequent production of ROS^{19,31}. At the same time, iron is capable of catalyzing several molecular reactions, which create ROS regardless of iron-anthracycline complexes, thus generating hydroxyl radicals. Recently, studies in humans have confirmed that even cumulative DOX doses at "safe intervals" are capable of inducing high levels of iron in the heart tissue, leading to the possibility of cardiotoxicity related to iron deposits as a new pathophysiological mechanism and raising the question of whether an actual "safe" dose exists in terms of preventing cardiomyopathy long-term⁴⁵.

Current strategies for minimizing cardiotoxic effects

Clinical strategies have been proposed in order to mitigate the cardiotoxicity of anthracyclines. Currently, there is no

treatment based on specific evidence for this cardiotoxicity. For each type of anthracycline, total recommended doses must not be exceeded or should only be exceeded with cardiac monitoring and/or pharmacological cardioprotection, but unfortunately, they do not completely eliminate the risk of cardiotoxicity^{32,46}.

The use of pharmacological cardioprotective agents:

Dexrazoxane is an iron chelating agent which reduces the formation of iron-anthracycline complex. ROS generation is limited without these complexes, thus restricting toxicity. Dexrazoxane also interferes with Topoisomerase IIB, thereby antagonizing the DNA damage induced by DOX. The use of carvedilol (a beta-blocking agent) provides cardioprotection by inhibiting ROS, thus preventing lipid peroxidation and increased concentrations of vitamin E in rats, but this study should continue to be developed in humans⁴⁸. Coenzyme Q (an antioxidant) is an important part of the mitochondrial respiratory chain, and it has been reported that its supplementation prevented the cardiotoxicity induced by anthracyclines. Glutathione (a thiol tripeptide) is another antioxidant which eliminates free radicals, and its supplementation can protect the heart from the effects of anthracyclines, as observed in vitro and in animals³³.

The role of physical exercise: Physical exercise has been suggested as an effective and low-cost non-pharmacological strategy to minimize or prevent myocardial damage associated with the treatment of DOX. Several mechanisms are activated during and after physical exercise in order to maintain or restore cellular homeostasis. Changes in intracellular concentrations of ATP with increased ADP and AMP levels, reduced glycogen reserves, temperature and pH changes, and loss of calcium homeostasis can be, among others, important stimuli to the increased formation of RONS (reactive oxygen and nitrogen species) in the myocardium during and after prolonged exercise. If this situation persists, there may be a modulatory effect on cardiac cell defense systems, in contrast to the previous idea that RONS mainly serve as a trigger for oxidative damage due to their role as a signaling molecule⁵¹.

Despite the lack of direct evidence of increased production of oxidants after acute exercise, changes in antioxidant systems in addition to oxidative myocardial injury markers

after acute exercise are strong indirect signs of redox disorders. It seems clear that when the myocardium is stimulated by acute exercise, it has increased cell signaling due to oxidative stress. On the other hand, the potential adaptability of the myocardium to exercise leads to careful analysis of the training effect, especially resistance training, on the modulation of the redox-oxidative system in the heart. The significant decrease in antioxidant capacity of the heart after exhausting all reserves following an extensive period of swimming in rats of both genders can also be an indication of additional RONS production⁵¹.

In a study by Scott et al., the cardioprotective properties of increased NRG1 (neuregulin 1 - cardiac and nervous system development pathway)/ErbB signaling are well described. Increased NRG1/ErbB signaling induced by drugs in the myocardium significantly improved cardiac function and survival in rodents who had left ventricular failure, inducing differentiated cardiomyocytes to proliferate. In vitro studies with isolated heart endothelial cells (the major source of NRG1 in the heart) have shown that mechanical stress increases the synthesis and release of endothelial NRG1, while NRG1 release is directly inhibited by angiotensin II and adrenergic agonists. Thus, increased synthesis of NRG1 in the ventricle in response to exercise-induced mechanical stress will induce suppression of neurohormonal factors, leading to cardioprotection⁵².

Aerobic exercise can also modulate a number of myocardial intracellular processes. One study indicated that exercise increases Akt (protein kinase B) of the myocardium, with subsequent attenuation of left ventricle pathological remodeling, fibrosis and protein degradation. Physical training increases PI3K activity (Phosphatidylinositol-3-kinase) of the myocardium with an effective decrease in the extent of myocardial and cardiomyocyte apoptosis in rats with myocardial ischemic reperfusion injury and improves survival in rats with dilated cardiomyopathy. These studies provide evidence for the protective effects of PI3K/Akt cell signaling. Endurance training prior to administration of DOX can protect the heart and skeletal muscles against toxicity induced by doxorubicin⁵³.

Physical training alone is effective in reducing mortality from heart failure induced by DOX. The results of the study by Chicco et al. demonstrate for the first time that physical training before DOX treatment protects against cardiac

dysfunction induced by DOX, while preserving the intrinsic cardiac function before treatment⁵⁴. The benefits of physical exercise may be due, at least in part, to restoring vascular smooth muscle relaxation properties, which in turn decrease peripheral vascular resistance and pressure on the heart⁵. Evidence has demonstrated that aerobic exercise prevents lipid peroxidation induced by DOX in the myocardium and reduces mortality. There is also an indication that physical exercise can protect the skeletal muscles against exacerbation of autophagy induced by doxorubicin⁵⁶.

It has been demonstrated that 10 weeks of preconditioning with exercise resulted in preserving cardiac function and reducing DOX accumulation in cardiac tissue. These results suggest that regular physical activity can be valuable complementary therapy to minimize cardiotoxicity that often occurs in patients who receive DOX treatment. In addition, patients who participate in exercise programs may be able to better tolerate exposure to the drug, resulting in increased survival and improved quality of life⁵⁷.

DISCUSSION

It is possible that more than one mechanism of cardiotoxicity may occur in the same individual, and many of them have not yet been fully clarified, in addition to possible cardioprotective strategies. Most studies are still performed in experimental animals and each one of those only studies one mechanism related to changes and loss of heart function. Moreover, simultaneous administration of other cardiotoxic drugs and radiotherapy can be correlated to an increased risk of cardiomyopathy and heart failure. In addition, other chronic diseases such as hypertension, diabetes mellitus, liver disease and prior heart disease³⁵ can also contribute to an increased risk of cardiotoxicity³².

Most studies describe oxidative stress, generation of free radicals and alterations in membrane structure and contractile apparatus of cardiomyocytes as the mechanisms which are mainly involved in cardiotoxicity from doxorubicin. Octavia et al.³² reported that the mechanism for this oxidative stress and ROS generation are also related to mitochondrial alterations present in cardiomyocytes. It is plausible that these events disrupt the mitochondrial metabolism and thus of the whole cell, since mitochondria

produce more than 90% of the ATP (adenosine triphosphate) used by cardiomyocytes. This functional disorder leads to pathological ultrastructural abnormalities such as mitochondrial swelling and forming of myelin figures, a loss of energy production capacity and difficulties in maintaining metabolic demands⁴⁴.

Compromised membrane integrity results in the hypothesis of increased ion influx into the cell. Intracellular calcium overload can trigger the indiscriminate activation of calcium-dependent proteases, especially calpain, resulting in the degradation of the main intracellular proteins which make up the cytoskeleton (especially dystrophin and associated proteins, and sarcomeric structure), activating proteases such as calpain, resulting in cardiomyopathy with consequent loss of contractile function^{29, 32, 42, 46}.

Despite the toxicity (with an emphasis on cardiotoxicity), anthracycline treatment efficiency explains its widespread use as a highlighted drug in the arsenal of anti-cancer medications⁵⁸. It is therefore essential to search for a solution, or solutions for the prevention and/or reduction of the cardiotoxic effects caused by using anthracyclines for cancer patients undergoing chemotherapy. The use of pharmacological agents such as Dexrazoxane⁴⁷, Carvedilol⁴⁸, Coenzyme Q⁴⁹, and Glutathione³³, in addition to physical activity have been demonstrated as cardioprotective strategies.

With regard to physical exercise and its possible protective role in the occurrence of cardiotoxicity, only animal studies have shown its effect on reducing structural and functional cardiac alterations caused by doxorubicin. One of the mechanisms involved in cardioprotection may be related to its antioxidant effects due to myocardial ability to adapt to the effects of aerobic exercise training⁵¹. Other mechanisms that could be involved in reducing cardiotoxic effects both through aerobic exercise and endurance training are related to cell signaling by NRG1/ErbB⁵² and the Pi3K/Akt⁵⁰ pathways, thereby reducing myocardium pathologic remodeling, protein degradation and apoptosis. Thus, in situations in which myocardial damage is significant and results in heart failure, physical training can reduce the risk of cardiotoxic manifestations after DOX treatment^{55, 56}.

Consequently, it is suggested that physical exercise positively modulates physiological mechanisms and raises some important cardiac defense systems to antagonize the

toxic effects caused by DOX treatment. Increased antioxidant capacity seems to be the consensus mechanism observed for cardiac protection with exercise. Additional beneficial adaptations that induce a heart phenotype which renders the heart more resistant to the deleterious effects of DOX administration may include increased expression of heat shock proteins (HSP), and anti-apoptotic proteins. A central role in this process should be attributed to mitochondrial adaptations resulting from exercise that can be beneficial to the myocardium in DOX-induced cardiomyopathy, a condition in which acute and chronic exercise would act as protectors¹⁶.

In the surveyed literature, studies on the cardiotoxicity mechanism attributed to anthracyclines, particularly doxorubicin, are not unified or definitive, and there still is not consensus about the best explanation for this occurrence. However, pharmacological and non-pharmacological cardioprotection measures are extremely important for these patients. Scientific evidence verifying the real effectiveness of physical exercise as a cardioprotective agent should be further explored/studied, taking into account issues such as at what point does exercise becomes cardioprotective (before or concomitantly to treatment); and which exercise would be more effective in promoting this cardioprotective action in terms of type, intensity, frequency and duration?

The authors declare that no competing interests exist and they all contributed equally to this work.

References

1. Kavazis AN, Smuder AJ, Powers SK. Effects of short-term endurance exercise training on acute doxorubicin-induced FoxO transcription in cardiac and skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2014; 117(3): 323-330.
2. Thakur A, Witteles RM. Cancer therapy-induced left ventricular dysfunction: interventions and prognosis. *J Card Fail* 2014; 20(3): 155-58.
3. Guimarães BM, Silva C, Noronha CP, Silva GS, Oliveira JFP, Pereira KA, et al. Estimativa 2014: Incidência de câncer no Brasil. Ministério da saúde. Instituto Nacional de Câncer. José Alencar Gomes da Silva. INCA 2014.

4. Minami M, Matsumoto S, Horiuchi H. Cardiovascular side-effects of modern cancer therapy. *Circ J* 2010; 74: 1779-1786.
5. Dolinsky VW, Rogan KJ, Sung MM, Zordoky BN, Haykowsky MJ, Young ME, et al. Both aerobic exercise and resveratrol supplementation attenuate doxorubicin-induced cardiac injury in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013; 305(2): E243-53.
6. Rafiyath SM, Rasul M, Lee B, Wei G, Lamba G, Liu D. Comparison of safety and toxicity of liposomal doxorubicin vs. conventional anthracyclines: a meta-analysis. *Exp Hematol Oncol* 2012; 1(1):10.
7. Chatterjee K, Zhang J, Honbo N, Karliner JS. Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology* 2010; 115(2): 155-62.
8. Lu P. Monitoring cardiac function in patients receiving doxorubicin. *Semin Nucl Med* 2005; 35(3): 197-201.
9. Ludke ARL, Al-Shudiefat AARS, Dhingra S, Jassal DS, Singal PK. A concise description of cardioprotective strategies in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Can J Physiol Pharmacol* 2009; 87(10): 756-63.
10. Tangponga J, Miriyalab S, Noelb T, Sinthupibulyakitb C, Jungsuwadeeb P, Clairb DKS. Doxorubicin-induced central nervous system toxicity and protection by xanthone derivative of garcinia mangostana. *Neuroscience* 2011; 175: 292-299.
11. 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.
12. Aissiou M, Périé D, Cheriet F, Dahdah NS, Laverdière C, Curnier D. Imaging of early modification in cardiomyopathy: the doxorubicin-induced model. *Int J Cardiovasc Imaging.* 2013; 29(7): 1459-1476.
13. Belham M, Kruger A, Mephram S, Faganello S, Pritchard C. Monitoring left ventricular function in adults receiving anthracycline-containing

- chemotherapy. *Eur J Heart Fail* 2007; 9(4): 409-14.
14. Lien CY, Jensen BT, Hydock DS, Hayward R. Short-term exercise training attenuates acute doxorubicin cardiotoxicity. *J Physiol Biochem* 2015; 71(4): 669-78.
 15. Chicco AJ, Schneider CM, Hayward R. Exercise training attenuates acute doxorubicin-induced cardiac dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006; 47(2): 182.
 16. Ascensão A, Oliveira PJ, Magalhães J. Exercise as a beneficial adjunct therapy during Doxorubicin treatment - Role of mitochondria in cardioprotection. *Int J Cardiol* 2012; 156(1): 4-10.
 17. Volkova M, Russell R. Anthracycline cardiotoxicity: prevalence, pathogenesis and treatment. *Current Cardiol Rev* 2011; 7(4): 214-20.
 18. Chatterjee K, Zhang J, Tao R, Honbo N, Karliner JS. Vincristine attenuates doxorubicin cardiotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 373(4): 555-60
 19. Salazar-Mendiguchía J, González-Costello J, Roca J, Ariza-Solé A, Manito N, Cequier A. Anthracycline-mediated cardiomyopathy: Basic molecular knowledge for the cardiologist. *Arch Cardiol Mex* 2014; 84(3): 218-23.
 20. Filho RK, Hajjar LA, Bacal F, Hoff PMG, Diz MDPE, Galas FRBG et al. I Diretriz brasileira de cardi-oncologia. *Arq Bras Cardiol* 2011; 96(2 suppl1): 1-52.
 21. Albini A, Pennesi G, Donatelli F, Cammarota R, De Flora S, Noonan DM. Cardiotoxicity of anticancer drugs: the need for cardio-oncology and cardio-oncological prevention. *J Natl Cancer Inst* 2010; 102(1): 14-25.
 22. Ewer EMS, Lippman SM. Type II chemotherapy-related cardiac dysfunction: time to recognize a new entity. *J Clin Oncol* 2005; 23 (13): 2900-02.
 23. Singal P, Li T, Kumar D, Danelisen I, Iliskovic N. Adriamycin-induced heart failure: mechanisms and modulation. *Mol Cell Biochem* 2000; 207(1-2): 77-86.
 24. 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 (1): 106-35.
 25. Rochette L, Guenancia C, Gudjoncik AI, Hachet O, Zeller M, Cottin Y, et al. Anthracyclines/trastuzumab: new aspects of cardiotoxicity and molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* 2015; 36(6): 326-48.
 26. Sawyer DB, Peng X, Chen B, Pentassuglia L, Lim CC. Mechanisms of anthracycline cardiac injury: can we identify strategies for cardio-protection? *Prog Cardiovasc Dis* 2010; 53(2): 105-13.
 27. Takemura G, Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog Cardiovasc Dis* 2007; 49: 330-52.
 28. Stěrba M, Popelová O, Vávrová A, Jirkovský E, Kovaříková P, Geršl V, Simůnek T. Oxidative stress, redox signaling, and metal chelation in anthracycline cardiotoxicity and pharmacological cardioprotection. *Antioxid Redox Signal* 2013; 18 (8): 899-929.
 29. Campos EC, O'Connell JL, Malvestio LM, Romano MMD, Ramos SG, Celes MRN, et al. Calpain-mediated dystrophin disruption may be a potential structural culprit behind chronic doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Eur J Pharmacol* 2011; 670(2-3): 541-53.
 30. Pecoraro M, Sorrentino R, Franceschelli S, Del Pizzo M, Pinto A, Popolo A. Doxorubicin-mediated cardiotoxicity: role of mitochondrial connexin 43. *Cardiovasc Toxicol* 2015; 15(4): 366-76.
 31. Tacara O, Sriamornsakb P, Dassa CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol* 2013; 65(2): 157-70.
 32. 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(6): 1213-25.
 33. Lipshultz SE, Sambatakos P, Maguire M, Karnik R, Ross SW, Franco VI, et al. Cardiotoxicity and

- cardioprotection in childhood cancer. *Acta Haematol* 2014; 132(3-4): 391-99.
34. Puma N, Ruggiero A, Ridola V, Maurizi P, Lazzareschi I, Attinà G, et al. Anthracycline-related cardiotoxicity: risk factors and therapeutic options in childhood cancers. *Signa Vitae* 2008; 3(1): 30-4.
 35. Schlitt A, Jordan K, Vordermark D, Schwamborn J, Langer T, Thomssen C. Cardiotoxicity and oncological treatments. *Dtsch Arztebl* 2014; 111(10): 161-8.
 36. Danialou G, Comtois AS, Dudley R, Karpati G, Vincent G, Des Rosiers C, et al. Dystrophin-deficient cardiomyocytes are abnormally vulnerable to mechanical stress-induced contractile failure and injury. *FASEB J* 2001; 15(9): 1655-7.
 37. Lapidos KA, Kakkar R, McNally EM. The dystrophin glycoprotein complex signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ Res* 2004; 94(8): 1023-31.
 38. Tidball JG, Wehling-Henricks M. The role of free radicals in the pathophysiology of muscular dystrophy. *Journal of Applied Physiology*. 2007; 102: 1677-86.
 39. Celes MR, Torres-Dueñas D, Malvestio LM, Blefari V, Campos EC, Ramos SG, Prado CM, Cunha FQ, Rossi MA. Disruption of sarcolemmal dystrophin and b-dystroglycan may be a potential mechanism for myocardial dysfunction in severe sepsis. *Lab Invest* 2010; 90(4): 531-42.
 40. Kawada T, Masui F, Tezuka A, Ebisawa T, Kumagai H, Nakazawa M et al. A novel scheme of dystrophin disruption for the progression of advanced heart failure. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1751(1): 73-81.
 41. Toyono-Oka T, Kawada T, Nakata J, Xie H, Urabe M, Masui F et al. Translocation and cleavage of myocardial dystrophin as a common pathway to advanced heart failure: a scheme for the progression of cardiac dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(19): 7381-5.
 42. Lim CC, Zuppinger C, Guo X, Kuster GM, Helmes M, Eppenberger HM et al. Anthracyclines induce calpain-dependent titin proteolysis and necrosis in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2004; 279(9): 8290-99.
 43. Chen B, Zhong L, Roush SF, Pentassuglia L, Peng X, Samaras S et al. Disruption of a GATA4/Ankrd1 signaling axis in cardiomyocytes leads to sarcomere disarray: Implications for anthracycline cardiomyopathy. *PLoS One* 2012; 7(4): e35743.
 44. Peng X, Guo X, Borkan SC, Bharti A, Kuramochi Y, Calderwood S et al. Heat shock protein 90 stabilization of ErbB2 expression is disrupted by ATP depletion in myocytes. *J Biol Chem* 2005; 280(13): 13148-52.
 45. Xu X, Persson HL, Richardson DR. Molecular pharmacology of the interaction of anthracyclines with Iron. *Mol Pharmacol* 2005; 68(2): 261-71.
 46. Šimůnek T, Štírba M, Popelová O, Adamcová M, Hrdina R, Geršl V. Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep* 2009; 61(1): 154-171.
 47. Lipschultz SE, Scully RE, Lipsitz SR, Sallan SE, Silverman LB, Millter TL, Barry EV, Asselin BL, Athale U, Clavell LA, Larsen E, Moghrabi A, Samson Y, Michon B, Schorin MA, Cohen HJ, Neuberg DS, Orav EJ, Colan SD: Assessment of dexrazoxane as a cardioprotectant in doxorubicin-treated children with high-risk acute lymphoblastic leukaemia: long-term follow-up of a prospective, randomised, multicenter trial. *Lancet Oncol* 2010; 11: 950-61.
 48. Matsui H, Morishima I, Numaguchi Y, Toki Y, Okumura K, Hayakawa T: Protective effects of carvedilol against doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *Life Sci* 1999; 65: 1265-74.
 49. Iarussi D, Auricchio U, Agretto A, Murano A, Giuliano M, Casale F, Indolfi P, Iacono A: Protective effect of coenzyme Q 10 on anthracyclines cardiotoxicity: control study in children with acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin lymphoma. *Mol Aspects Med* 1994; 15(suppl.): s207-s212

50. Weeks KL, Gao X, Du XJ, Boey EJ, Matsumoto A, Bernardo BC, et al. Phosphoinositide 3-kinase p110 α is a master regulator of exercise-induced cardioprotection and PI3K gene therapy rescues cardiac dysfunction. *Circ Heart Fail* 2012; 5(4): 523-34.
 51. Ascensão A, Ferreira R, Magalhães J. Exercise-induced cardioprotection — biochemical, morphological and functional evidence in whole tissue and isolated mitochondria. *Int J Cardiol* 2007; 117(1): 16-30.
 52. Scott JM, Lakoski S, Mackey JR, Douglas PS, Haykowsky MJ, Jones LW. The potential role of aerobic exercise to modulate cardiotoxicity of molecularly targeted cancer therapeutics. *Oncologist* 2013; 18(2): 221-31.
 53. Kavazis AN, Smuder AJ, Powers SK. Effects of short-term endurance exercise training on acute doxorubicin-induced FoxO transcription in cardiac and skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2014; 117(3): 223-30.
 54. Chicco AJ, Schneider CM, Hayward R. Exercise training attenuates acute doxorubicin-induced cardiac dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006; 47(2): 182-89.
 55. Matsuura C, Brunini TMC, Carvalho LCMM, Resende AC, Carvalho JJ, Castro JPW, et al. Exercise training in doxorubicin-induced heart failure: effects on the L-arginine–NO pathway and vascular reactivity. *J Am Soc Hypertens* 2010; 4(1): 7-13.
 56. Smuder AJ, Kavazis AN, Min M, Powers SK. Exercise protects against doxorubicin-induced markers of autophagy signaling in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2001; 111(4): 1190-98.
 57. Jensen BT, Lien CY, Hydock DS, Schneider CM, Hayward R. Exercise mitigates cardiac doxorubicin accumulation and preserves function in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 2013; 62(3): 263-9.
- Cardinale D, Colombo A, Lamantia G, Colombo N, Civelli M, De Giacomo G, Rubino M, Veglia F, Fiorentini C, Cipolla CM. Anthracycline-induced cardiomyopathy: Clinical relevance and response to pharmacologic therapy. *J Am College Cardiol* 2010; 55: 213-20.
- 1.

ANEXO A – Carta do comitê de ética



Universidade Federal de Uberlândia
– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 022/14, sobre o projeto de pesquisa intitulado “Efeitos cardiovasculares da associação do hormônio tireoidiano e do exercício físico em ratos com insuficiência cardíaca induzida pela doxorrubicina”, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Elmiro Santos Resende** está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal conforme regulamentações do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) – UFU em reunião de **29 de Agosto de 2014**.

(We certify that the protocol nº 022/14, about “Efeitos cardiovasculares da associação do hormônio tireoidiano e do exercício físico em ratos com insuficiência cardíaca induzida pela doxorrubicina”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES ON ANIMAL RESEARCH as regulations of National Advice of Control and Animal Experimentation (CONCEA) and approved by Ethics Commission on Use of Animals (CEUA) – Federal University of Uberlândia in 29/08/2014).

Uberlândia, 01 de setembro de 2014.

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU

Anexo B

Passo-a-passo da preparação histológica.

Coloração eosina/hematoxilina*Passo I: Inclusão do material em parafina*

- Fixado o material em formol
- Cortado o músculo cardíaco e colocado em K7
- O material foi disposto em álcool a 70% por 30min
- Álcool 85% por 30min
- Álcool 95% por 30min
- Álcool absoluto I por 30 min
- Álcool absoluto II por 30 min
- Álcool absoluto III por 30 min
- Retirar o excesso de álcool em papel toalha
- Xilol I por 30 min
- Xilol II por 30 min
- Xilol III por 30 min
- Retirar o excesso em papel toalha
- Parafina I
- Parafina II
- Parafina III
- Inclusão em bloco de parafina.

O bloco foi cortado em micrótomo (5micra) sendo realizados dois cortes em cada lamina.

Passo II: Hidratar (desparafinizar)

- Xilol III por 10 min
- Xilol II por 10 min
- Xilol I por 10 min
- Retirar o excesso com papel toalha
- Álcool absoluto III por 30 seg

- Álcool absoluto II por 10 seg
- Álcool absoluto I por 10 seg
- Álcool 95% por 10 seg
- Álcool 85% por 10 seg
- Álcool 70% por 10 seg
- Água corrente por 20 min
- Água destilada por 5 min
- Clorada com hematoxilina de Harris por 30 seg
- Água corrente 20 min
- Água destilada 5 min
- Corado com eosina/floxina de 1min, 30 seg e 2min
- Água corrente para retirar o excesso de eosina
- Água destilada por 4 seg

Passo III: Desidratar (Diafanizar)

- Álcool 70% por 10 seg
- Álcool 85% por 10 seg
- Álcool 95% por 10 seg
- Álcool absoluto I por 10 seg
- Álcool absoluto II por 10 seg
- Álcool absoluto III por 10 seg
- Retirar o excesso de álcool em papel toalha
- Xilol I por 30 seg
- Xilol II por 30 seg
- Xilol III por 30 seg

Coloração com picrosirius red

Passo I: Inclusão do material em parafina

- Fixado o material em formol
- Cortado o músculo cardíaco e colocado em K7

- O material foi disposto em álcool a 70% por 30min
- Álcool 85% por 30min
- Álcool 95% por 30min
- Álcool absoluto I por 30 min
- Álcool absoluto II por 30 min
- Álcool absoluto III por 30 min
- Retirar o excesso de álcool em papel toalha
- Xilol I por 30 min
- Xilol II por 30 min
- Xilol III por 30 min
- Retirar o excesso em papel toalha
- Parafina I
- Parafina II
- Parafina III
- Inclusão em bloco de parafina.

O bloco foi cortado em micrótomo (5 micra) sendo realizados dois cortes em cada lamina.

Passo II: Hidratar (desparafinizar)

- Xilol III por 10 min
- Xilol II por 10 min
- Xilol I por 10 min
- Retirar o excesso com papel toalha
- Álcool absoluto III por 30 seg
- Álcool absoluto II por 10 seg
- Álcool absoluto I por 10 seg
- Álcool 95% por 10 seg
- Álcool 85% por 10 seg
- Álcool 70% por 10 seg

- Água corrente por 20 min
 - Água destilada por 5 min
- Secar o excesso com papel toalha
- Ácido fosfomolibidênico 0,2% por 2 min

Secar o excesso com papel toalha

- Picrosirius red por 90 min
- Secar o excesso com papel toalha
- Solução HCL a 0,01% N por 2 min
 - Água corrente por 15 min
 - Água destilada por 5 min

Passo III: Desidratar (Diafanizar)

- Álcool 70% por 10 seg
- Álcool 85% por 10 seg
- Álcool 95% por 10 seg
- Álcool absoluto I por 10 seg
- Álcool absoluto II por 10 seg
- Álcool absoluto III por 10 seg
- Retirar o excesso de álcool em papel toalha
- Xilol I por 30 seg
- Xilol II por 30 seg
- Xilol III por 30 seg
- Montar a lâmina com entelan