

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação

Mariana Duarte de Souza

**TREINAMENTO FÍSICO AERÓBICO PROMOVE EFEITO CARDIOPROTETOR
CONTRA A CARDIOTOXICIDADE INDUZIDA POR DOXORRUBICINA EM
MODELO MURINO DE CÂNCER DE MAMA**

Belo Horizonte

2024

Mariana Duarte de Souza

**TREINAMENTO FÍSICO AERÓBICO PROMOVE EFEITO CARDIOPROTETOR
CONTRA A CARDIOTOXICIDADE INDUZIDA POR DOXORRUBICINA EM
MODELO MURINO DE CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Reabilitação da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Reabilitação.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Fonseca Lemos de Oliveira.

Coorientadora: Dra. Brígida Gomes de Almeida Schirmer

Belo Horizonte

2024

S729t Souza, Mariana Duarte de
2024 Treinamento físico aeróbio promove efeito cardioprotetor contra a cardiotoxicidade induzida por doxorubicina em modelo murino de câncer de mama. [manuscrito] / Mariana Duarte de Souza - 2024.
108 f.: il. Tabs.

Orientador: Luciano Fonseca Lemos de Oliveira
Coorientadora: Brígida Gomes de Almeida Schirmer

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional.
Bibliografia: f. 88-97

1. Quimioterapia - Teses. 2. Exercícios aeróbicos - Teses. 3. Câncer de mama - Teses. I. Oliveira, Luciano Fonseca Lemos de. II. Schirmer, Brígida Gomes de Almeida. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional. IV. Título.

CDU: 615.28

Ficha catalográfica elaborada pelo Bibliotecário Antônio Afonso Pereira Júnior, CRB6: nº 2637 da Biblioteca da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional da UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA MARIANA DUARTE DE SOUZA

Realizou-se, no dia 06 de março de 2024, às 14:00 horas, no Auditório Maria Lúcia Paixão, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *Treinamento físico aeróbico promove efeito cardioprotetor sobre a cardiotoxicidade induzida por doxorubicina em modelo murino de câncer de mama*, apresentada por MARIANA DUARTE DE SOUZA, número de registro 2021705654, graduada no curso de FISIOTERAPIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Luciano Fonseca Lemos de Oliveira - Orientador (Universidade Federal do Triângulo Mineiro), Prof(a). Danielle Aparecida Gomes Pereira (Universidade Federal de Minas Gerais), Prof(a). Denise Mayumi Tanaka (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto).

A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 06 de março de 2024.

Documento assinado digitalmente
 LUCIANO FONSECA LEMOS DE OLIVEIRA
Data: 11/03/2024 11:37:41-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>


Prof(a). Luciano Fonseca Lemos de Oliveira (Doutor)

Documento assinado digitalmente
 DANIELLE APARECIDA GOMES PEREIRA
Data: 11/03/2024 17:51:53-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof(a). Danielle Aparecida Gomes Pereira (Doutora)

Documento assinado digitalmente
 DENISE MAYUMI TANAKA
Data: 11/03/2024 12:43:30-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof(a). Denise Mayumi Tanaka (Doutora)

Documento assinado digitalmente
 BRIGIDA GOMES DE ALMEIDA SCHIRMER
Data: 11/03/2024 11:26:40-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof(a). Brígida Gomes de Almeida Schirmer (Doutora)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO

UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

Treinamento físico aeróbico promove efeito cardioprotetor sobre a cardiotoxicidade induzida por doxorubicina em modelo murino de câncer de mama

MARIANA DUARTE DE SOUZA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO, área de concentração DESEMPENHO FUNCIONAL HUMANO.

Aprovada em 06 de março de 2024, pela banca constituída pelos membros:

Documento assinado digitalmente
gov.br LUCIANO FONSECA LEMOS DE OLIVEIRA
Data: 12/03/2024 11:36:22-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof(a). Luciano Fonseca Lemos de Oliveira - Orientador
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Documento assinado digitalmente
gov.br DANIELLE APARECIDA GOMES PEREIRA
Data: 13/03/2024 13:42:56-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof(a). Danielle Aparecida Gomes Pereira
Universidade Federal de Minas Gerais

Documento assinado digitalmente
gov.br DENISE MAYUMI TANAKA
Data: 12/03/2024 14:29:02-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof(a). Denise Mayumi Tanaka
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Belo Horizonte, 6 de março de 2024.

Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais,
Maria do Carmo e Jose dos santos,
ao meu irmão Marciano e à minha tia Maria
Imaculada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pelo dom da vida, por todas as oportunidades a mim ofertadas, pela sabedoria e por me conduzir ao fim desse desafio de modo ténue.

Agradeço a minha família, por todo apoio e orações. Ao meu pai Jose dos Santos, exemplo de homem batalhador e humilde, que com seu árduo trabalho me possibilitou o estudo e a educação. À minha mãe Maria do Carmo por ser meu maior exemplo de fortaleza, honestidade, simplicidade, sabedoria e por ser minha incentivadora. Ao meu irmão Marciano pelo apoio e incentivo e a minha tia Maria Imaculada pelas constantes orações e vibrações positivas.

Agradeço ao meu namorado Rafael por todo amor, companheirismo, carinho, paciência e pelo incentivo.

Agradeço ao meu orientador, o Prof. Dr. Luciano Oliveira pela confiança desde o momento que aceitou meu pedido de orientação. Por toda paciência e ensinamentos. Obrigada pela enorme contribuição no meu crescimento acadêmico e pelas oportunidades em participar de outras pesquisas e do projeto de extensão Reabkids.

A minha coorientadora Dra. Brígida todo carinho, paciência, ensinamentos, conselhos, amizade e por todo cuidado. Uma pessoa admirável que contribuiu em todas as etapas do meu projeto e me acolheu como uma mãe em BH.

Agradeço ao Dr. Carlos Malamut por ter me recebido de braços aberto no CDTN, por todo aprendizado, carinho, ensinamentos, cuidado e amizade.

À Bruna Lorena por todos os conselhos, companheirismo, amizade, pelas palavras de apoio e por deixar essa trajetória um pouco mais leve.

Agradeço a Dra. Juliana Oliveira pela parceria e colaboração durante o estudo. À Dra. Andreia por todos ensinamentos e manutenção no laboratório de imagem molecular e no MicroPET e ao Leonardo e os colaboradores da Unidade de Pesquisa e Produção de Radiofármacos (UPPR).

Agradeço ao CDTN - CNEN pela oportunidade de conduzir os experimentos em seus laboratórios e pelo fornecimento dos radiofármacos.

À Prof. Dra. Virginia Lemos pela oportunidade de conduzir a parte histológica em seu laboratório e por todos os recursos fornecidos. Agradeço a Doutoranda Natália e ao aluno de iniciação científica Thalles por toda amizade, companheirismo e contribuição durante os experimentos e análise histológica.

Agradeço ao Prof. Dr. Dawit Gonçalves do LAFISE – UFMG pela oportunidade de conduzir a parte do treinamento físico em seu laboratório e ao mestrando Pedro por contribuir durante a realização do treinamento e nos testes.

À Prof. Dra. Fernanda Lanza pela oportunidade de aprendizado e participar do projeto de extensão Reabkids.

Aos alunos de iniciação científica Enrico, Ianara e Rafael pela contribuição, dedicação no estudo. Agradeço ao Thalles pela contribuição durante a análise do estresse oxidativo e da Ana Luísa e Ianara durante análise de inflamação. E ao Time Cardio por todos ensinamentos compartilhado, em especial ao André, Enrico, Rafael, Fábio, Jhébica e Thayrine por toda amizade e companheirismo nos congressos e viagens.

Às agências de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Cada pessoa que contribuiu de forma direta ou indiretamente, neste trabalho teve papel importante para que fosse finalizado.

Muito Obrigada!

RESUMO

A doxorubicina (Doxo) é um quimioterápico utilizado no câncer de mama. Entretanto, a Doxo pode provocar efeitos colaterais como a cardiotoxicidade. Em adição, o próprio tumor promove alterações metabólicas dos cardiomiócitos. O treinamento físico aeróbico (TFA) apresenta potencial de mitigação dos efeitos da quimioterapia e tumor sobre os cardiomiócitos. O objetivo deste estudo foi caracterizar um modelo pré-clínico de cardiotoxicidade e avaliar o efeito cardioprotetor do TFA. A primeira etapa do estudo consistiu na padronização da cardiotoxicidade. Para isso, os animais foram divididos em quatro grupos: Controle (Ct), Doxo (Doxo), Tumor (Tm), Tumor+Doxo (Tm+Doxo). Foram inoculadas 2×10^5 células EO771 tumor de mama subclassificado com luminal B na primeira glândula cervical direita. O tratamento com a Doxo foi realizado uma vez por semana, com duração de cinco semanas, uma dose de (5mg/Kg), iniciado sete dias após a inoculação das células. A segunda etapa consistiu na avaliação do efeito cardioprotetor do TFA. Nesta etapa os animais foram divididos em dois grupos: Tumor+Doxo Sedentário (Tm+Doxo SED) e Tumor+Doxo TFA. O TFA foi iniciado juntamente com o tratamento da Doxo. Os testes de esforço cardiopulmonar (TCP) e de força muscular foram realizados antes e após o TFA. Em ambas etapas, os animais foram submetidos a imagem de PET para avaliação do metabolismo e função do miocárdica com fluordeoxiglicose (^{18}F -FDG) (SUV) nas semanas 2 (S2), semana 4 (S4) e semana 6 (S6) após o início do protocolo. A análise histopatológica incluiu a quantificação da intensidade das espécies reativas de oxigênio (ROS) e inflamação (CD68) no miocárdio. Na primeira etapa houve queda progressiva da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) nos grupos Doxo (S2 vs S6, $p=0,037$) e Tm+Doxo (S2 vs S4, $p=0,024$; S2 vs S6, $p=0,003$). Foi observado aumento progressivo da captação miocárdica de ^{18}F -FDG em todos os grupos experimentais ($p < 0,05$), exceto no grupo Ct. Foi observado aumento importante de ROS no grupo Doxo. O grupo Doxo, assim como no grupo Tm+Doxo ($p=0,001$) apresentaram maior intensidade de inflamação. Na segunda etapa, houve queda progressiva da FEVE no grupo Tm+Doxo SED (S2 vs S4, $p=0,024$; S2 vs S6, $p=0,003$) que não foi observada no grupo Tm+Doxo TFA ($p > 0,05$). O grupo de animais submetidos ao TFA apresentou menor produção de ROS e menor inflamação miocárdicas. O TFA impediu a queda do consumo máximo de oxigênio no pico do exercício ($\text{VO}_{2\text{pico}}$) e aumentou a tolerância ao exercício. O TFA foi capaz também de impedir a redução de força muscular esquelética. O modelo caracterizado induziu a cardiotoxicidade e apresentou alterações miocárdicas. Além disso, o TFA mostrou-se eficaz na proteção contra a cardiotoxicidade da Doxo. Reduziu a captação miocárdica de glicose, diminuiu ROS e inflamação, e preservou a função cardíaca, além de manter o desempenho físico. Esses achados destacam seu potencial como estratégia complementar no tratamento do câncer de mama.

Palavras - chaves: Doxorubicina; Cardiotoxicidade; Treinamento físico aeróbico.

ABSTRACT

Doxorubicin (Doxo) is a chemotherapy drug used in breast cancer. However, Doxo can cause side effects such as cardiotoxicity. In addition, the tumor itself promotes metabolic changes in cardiomyocytes. Aerobic physical training (AFT) has the potential to alleviate the effects of chemotherapy and tumors on cardiomyocytes. This study aimed to characterize a preclinical model of cardiotoxicity and evaluate the cardioprotective effect of TFA. The first stage of the study consisted of standardizing cardiotoxicity. For this, the animals were divided into four groups: Control (Ct), Doxo (Doxo), Tumor (Tm), Tumor+Doxo (Tm+Doxo). 2×10^5 EO771 breast tumor cells subclassified with luminal B were inoculated into the first right cervical gland. Treatment with Doxo was carried out once a week, lasting five weeks, at a dose of (5mg/kg), starting seven days after cell inoculation. The second stage consisted of evaluating the cardioprotective effect of TFA. At this stage, the animals were divided into two groups: Tumor+Doxo Sedentary (Tm+Doxo SED) and Tumor+Doxo TFA. TFA was started along with Doxo treatment. Cardiopulmonary exercise (CPT) and muscle strength tests were performed before and after TFA. In both stages, the animals underwent PET imaging to evaluate metabolism and myocardial function with fluorodeoxyglucose (^{18}F -FDG) (SUV) in weeks 2 (W2), week 4 (W4) and week 6 (W6) after the start of the protocol. Histopathological analysis included quantification of the intensity of reactive oxygen species (ROS) and inflammation (CD68) in the myocardium. In the first stage, there was a progressive drop in left ventricular ejection fraction (LVEF) in the Doxo (W2 vs W6, $p = 0.037$) and Tm+Doxo (W2 vs W4, $p = 0.024$; W2 vs W6, $p = 0.003$) groups. A progressive increase in myocardial ^{18}F -FDG uptake was observed in all experimental groups ($p < 0.05$), except in the Ct group. A significant increase in ROS was observed in the Doxo group. The Doxo group, as well as the Tm+Doxo group ($p = 0.001$) showed greater intensity of inflammation. In the second stage, there was a progressive drop in LVEF in the Tm+Doxo SED group (W2 vs W4, $p = 0.024$; W2 vs W6, $p = 0.003$) which was not observed in the Tm+Doxo TFA group ($p > 0.05$). The group of animals subjected to TFA showed lower ROS production and less myocardial inflammation. TFA prevented the drop in maximum oxygen consumption at peak exercise ($\text{VO}_{2\text{peak}}$) and increased exercise tolerance. TFA was also able to prevent the reduction in skeletal muscle strength. The characterized model induced cardiotoxicity and presented myocardial changes. Furthermore, TFA was shown to be effective in protecting against Doxo cardiotoxicity. It reduced myocardial glucose uptake, decreased ROS and inflammation, and preserved cardiac function, in addition to maintaining physical performance. These findings highlight its potential as a complementary strategy in the treatment of breast cancer.

Keywords: Doxorubicin; Cardiotoxicity; Aerobic physical training.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Complexa interação entre insuficiência cardíaca e câncer.....	25
Figura 2- Principais mecanismos causadores de morte celular mediada por Doxo.....	28
Figura 3 - Desenho experimental da caracterização do modelo de cardiotoxicidade em animais com câncer de mama e da avaliação do efeito cardioprotetor do TFA.....	42
Figura 4 – Inoculação das células tumorais na primeira glândula cervical direita....	44
Figura 5 - Tratamento com Doxo via intravenoso.....	45
Figura 6 - Sistema MicroPET dedicado para aquisição e reconstrução de imagens de tomografia positrônica para pequenos animais (General Electric Healthcare modelo LabPET 4 solos).....	47
Figura 7- Hiperpigmentação nos animais que receberam tratamento com Doxo	56
Figura 8 - Peso corporal dos animais durante o experimento.....	57
Figura 9 - Probabilidade de sobrevivência.....	58
Figura 10 - Avaliação da FEVE.....	60
Figura 11 - Captação do SUV no ventrículo Esquerdo.....	62
Figura 12 - Mensuração da glicemia pré injeção de FDG.....	63
Figura 13 - Avaliação do crescimento Tumoral e captação do SUV.....	64
Figura 14 - Avaliação da produção de ROS no coração.....	65
Figura 15 - Avaliação do processo inflamatório nos cardiomiócitos.....	66
Figura 16 - Gráficos de dispersão ilustrando a correlação entre a FEVE E SUV	67
Figura 17 - Gráficos de dispersão ilustrando a correlação entre a glicemia e SUV.....	68
Figura 18 - Peso corporal dos animais durante o TFA	69
Figura 19 - Probabilidade de sobrevivência durante o experimento TFA.....	70

Figura 20- Avaliação da FEVE durante o TFA.....	72
Figura 21 - Captação do SUV no ventrículo Esquerdo durante o TFA.....	73
Figura 22 - Glicemia Sanguínea durante o TFA.....	74
Figura 23 - Avaliação do crescimento e atividade Tumoral durante o TFA.....	75
Figura 24 - Avaliação da inflamação e da produção de ROS durante o TFA	76
Figura 25 - Capacidade cardiorrespiratória e força muscular durante o TFA	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Protocolo de familiarização planejado para ensinar os camundongos correr na esteira rolante.....	49
Tabela 2 - Protocolo do teste de VO ₂ em camundongos.....	50
Tabela 3 - Protocolo de TFA dos camundongos.....	51
Tabela 4 - Sumário dos resultados da avaliação da função sistólica e morfologia ventricular esquerda dos animais.....	58
Tabela 5 - Sumário dos resultados da avaliação da função sistólica e morfologia ventricular esquerda dos animais.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLA

¹⁸ F-FDG	Fluordesoxiglicose
A. U	Unidade arbitrárias
ATP	Adenosina Trifosfato
BNP	Peptídios natriurético tipo B
DAC	Doença arterial coronariana
DCV	Doenças cardiovasculares
DHE	Diidroetílio
DM	Diabetes mellitus
DNA	Desoxirribonucleico
Doxo	Doxorrubicina
ECG	Eletrocardiograma
ER	Receptores de estrógeno
FDA	Food and drug administration
FEVE	Fração de ejeção de ventrículo esquerdo
GLUTs	Transportadores de glicose
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HER	Human epidermal growth factor receptor
HER-2	Receptor humano do fator de crescimento epidérmico 2
IC	Insuficiência cardíaca
LSO	Cério oxiortossilicato de lutécio
LYSO	Oxiortossilicato de lutécio e ítrio
MET	Equivalente metabólico
NF-kB	Fator de transcrição como fator nuclear
OMS	Organização mundial da saúde
PET	Tomografia por emissão de pósitrons
PR	Progesterona
ROI	Região de interesse
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SUV	Valores de captação padronizado
TCP	Teste cardiopulmonar
TFA	Treinamento físico aeróbico

Top II	Topoisomerase II
$VO_{2\text{pico}}$	Consumo de oxigênio pico
VRI	Ventriculografia radioisotópica
β^+	Isótopo emissor de pósitrons

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	19
2.REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 Câncer de Mama.....	23
2.2 Doenças cardiovasculares e o câncer.....	24
2.3 Doxorubicina.....	24
2.4 Cardiotoxicidade.....	27
2.5 Imagem de tomografia por emissão de pósitrons (PET).....	28
2.6 Fluordesoxiglicose (¹⁸ F-FDG).....	33
2.7 Redução de capacidade funcional.....	33
2.8 Exercício Físico.....	34
3. JUSTIFICATIVA	36
4. OBJETIVOS	39
4.1 Objetivo Geral.....	39
4.2 Objetivos Específicos.....	39
5 MATERIAIS E MÉTODOS	40
5.1 Animais.....	40
5.2 Delineamento geral do estudo.....	41
5.3 Grupos Experimentais.....	42
5.4 Cultura de Células.....	43
5.5 Modelo murino de tumor de mama E0771.....	44
5.6 Tratamento com Doxo.....	45
5.8 Análise das Imagens.....	48
5.9 Avaliação da Capacidade Aeróbica.....	48
5.9.1 Treinamento Físico Aeróbico	50
5.10 Avaliação da Força.....	50

5.11 Eutanásia e Coleta de Tecidos.....	52
5.11.1 Avaliação in situ da expressão do CD68 no coração.....	53
5.11.2 Avaliação in situ da produção de espécies reativas de oxigênio no coração.....	54
5.12 Análise Estatística.....	54
6. RESULTADOS.....	56
6.1 Padronização do modelo de cardiotoxicidade.....	56
6.1.1 Avaliação clínica e de mortalidade.....	56
6.1.2 Função sistólica e morfologia ventricular esquerda pelas imagens pet sincronizadas com o ECG.....	58
6.1.3 Análise do metabolismo miocárdico do ventrículo esquerdo.....	61
6.1.4 Glicemia sanguínea.....	62
6.1.5 Avaliação do crescimento tumoral e captação de ¹⁸F-FDG.....	63
6.1.6 Avaliação da produção de ROS.....	65
6.1.7 Avaliação do processo inflamatório nos cardiomiócitos.....	66
6.1.8 Mecanismos associados ao aumento da captação de ¹⁸F-FDG e à cardiotoxicidade.....	67
6.2 Segunda etapa: efeito cardioprotetor do TFA.....	69
6.2.1 Avaliação clínica e de mortalidade.....	69
6.2.2 Função sistólica e morfologia ventricular esquerda pelas imagens PET sincronizadas com o ECG.....	70
6.1.3 Análise do metabolismo miocárdico do ventrículo esquerdo.....	72
6.2.4 Glicemia sanguínea.....	73
6.2.5 Avaliação do crescimento e metabolismo da glicose tumoral.....	74
6.2.6 Avaliação da produção de ROS e da inflamação miocárdica.....	76
6.2.7 Capacidade cardiorrespiratória e força muscular.....	77

7. DISCUSSÃO.....	78
7.1 Principais achados.....	78
7.2 Caracterização do modelo.....	78
7.2 Efeito cardioprotetor do TFA.....	82
8. LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	85
9. CONCLUSÃO.....	86
REFERÊNCIAS.....	87
ANEXO A – Comissão de ética no uso de animais.....	99
APÊNDICES A – Minicurrículo.....	103

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um importante problema de saúde pública, sendo a segunda maior causa de morte natural afetando milhões de pessoas em todo o mundo. Em 2020, houve uma estimativa de 19,3 milhões de novos casos e 10 milhões de mortes por câncer em todo o mundo e até 2040, prevê – se que o número de diagnóstico por câncer possa aumentar rapidamente (SIEGEL; MILLER; WAGLE; JEMAL, 2023).

Por outro lado, nas últimas décadas o tratamento do câncer tem sofrido avanços, o que tem levado a um aumento na taxa de sobrevivência desses pacientes. A taxa de sobrevivência em 5 anos passou de 75% no ano de 1977 a 90% na era presente, em consequência do diagnóstico precoce, progressão do rastreamento e estratégias de tratamentos abrangentes e adjuvantes (ALTER, BLANCHE P; GIRI, NEELAM; SAVAGE, SHARON A; PETERS, JUNE A *et al.*, 2010; STURGEON, KATHLEEN M; KY, BONNIE; LIBONATI, JOSEPH R; SCHMITZ, KATHRYN H, 2014). No entanto, com o aumento da taxa de sobrevivência desses pacientes com câncer, está surgindo uma maior preocupação com eventos secundários de longo prazo, relacionados às doenças cardiovasculares. Até o momento estima-se que a incidência de insuficiência cardíaca (IC) em pacientes que receberam o tratamento com quimioterápicos seja de 3%, com uma taxa de mortalidade de mais de 60% em 2 anos (CHEN, J. J.; WU, P.-T.; MIDDLEKAUFF, H. R.; NGUYEN, K.-L., 2017; YOOD; WELLS; ALFORD; DAKKI *et al.*, 2012).

Dentre os quimioterápicos disponíveis para o tratamento oncológico, as antraciclinas como a doxorrubicina (Doxo), são as mais utilizadas para o tratamento de pacientes com câncer de mama. Esses agentes quimioterápicos são fundamentais para a redução do tumor e aumento da sobrevida dos pacientes com câncer, mas, no entanto, provocam sérios efeitos colaterais que têm sido alvos de estudos (CHEN, J. J.; WU, P. T.; MIDDLEKAUFF, H. R.; NGUYEN, K. L., 2017; STURGEON, K. M.; KY, B.; LIBONATI, J. R.; SCHMITZ, K. H., 2014). Devido ao tratamento, esses pacientes podem adquirir dano cardíaco permanente o que eleva a mortalidade pela doença cardiovascular e não pela reincidência do câncer de mama (RABELO; CORDEIRO; AQUINO; FONSECA *et al.*, 2019). Infelizmente, a doença cardíaca é a causa mais comum da morte de pacientes com câncer de mama e que viveram mais do que 9 anos após o tratamento (PATNAIK, JENNIFER L; BYERS, TIM; DIGUISEPPI,

CAROLYN; DABELEA, DANA *et al.*, 2011). Além disso, cabe salientar que a presença de disfunção miocárdica grave leva a interrupção, temporária ou permanente, do tratamento quimioterápico, podendo contribuir para a reincidência ou agravamento do câncer.

Um dos principais efeitos adversos causados pela Doxo é a cardiotoxicidade, caracterizado por danos causados no miocárdio decorrente do tratamento quimioterápico. Entre os possíveis mecanismos fisiopatológicos destacam-se o estresse oxidativo e o processo inflamatório levando a apoptose dos miócitos e fibrose miocárdica culminando em IC. Dessa forma, para melhor intervenção contra esses efeitos colaterais são necessários mais estudos para elucidar os mecanismos fisiopatológicos da cardiotoxicidade e detectar precocemente o envolvimento miocárdico. Além disso, é importante identificar os marcadores prognósticos que podem favorecer a intervenção precoce e desenvolvimento de estratégias que possam prevenir ou restaurar a disfunção miocárdica (<estimativa-2023.pdf> ; ASSELIN; LAM; CHEUNG; EEKHOUDT *et al.*, 2020; HAJJAR; COSTA; LOPES; HOFF *et al.*, 2020).

Atualmente, o diagnóstico da cardiotoxicidade é confirmado através de alterações cardiovasculares novas ou após o tratamento, por alterações em biomarcadores como Troponina I ou T, peptídeos natriurético tipo B (BNP) ou N Terminas – pré BNP ou exames de imagens cardiovascular como o eletrocardiograma, ecocardiograma, ressonância magnética cardíaca (HAJJAR; COSTA; LOPES; HOFF *et al.*, 2020).

Além desses exames de imagem, a tomografia por emissão de pósitrons (PET), que é frequentemente utilizada para rastreamento de tumores, pode ser uma modalidade de imagem promissora para o diagnóstico da cardiotoxicidade (BECKER; ARRUDA; BERENGUER; BURIL *et al.*, 2023). Trata-se de uma modalidade de imagem molecular, quantitativa, não invasiva, utilizada para avaliar processos metabólicos diversos *in vivo*. Para a aquisição das imagens PET é utilizado uma molécula marcadora com isótopo emissor de pósitrons (β^+) conhecida como radiofármacos (ALCANTARA; LEAL; GARCÍA-BOCANEGRA; GARCÍA-MARTÍN, 2014).

O Fluordesoxiglicose (^{18}F -FDG) é um análogo da glicose que é rotineiramente utilizado na investigação e monitorização clínica de indivíduos com suspeita ou

confirmação de câncer. Além disso, o ^{18}F -FDG pode ser utilizado também para investigar a presença de processos inflamatórios miocárdicos (NAHRENDORF; FRANTZ; SWIRSKI; MULDER *et al.*, 2015; NENSA; KLOTH; TEZGAH; POEPEL *et al.*, 2018) e/ou avaliar o metabolismo miocárdico (KNUUTI; SCHELBERT; BAX, 2002; MACHAC; BACHARACH; BATEMAN; BAX *et al.*, 2006).

Em pacientes com cardiotoxicidade, acredita-se o ^{18}F -FDG pode ser um marcador precoce de cardiotoxicidade. O aumento das captações de ^{18}F -FDG está intimamente relacionado com o dano no miocárdio. O ^{18}F -FDG é capaz de identificar a resposta da via das pentoses fosfato ao estresse oxidativo no retículo endoplasmático, podendo mostrar anormalidades metabólicas e danos precoces no miocárdio (BECKER; ARRUDA; BERENGUER; BURIL *et al.*, 2023).

Por outro lado, o crescimento tumoral depende do fornecimento permanente de glicose que geralmente é obtido a partir da reprogramação do metabolismo da glicose mediada pelas células tumorais nos indivíduos com câncer (SCHWARTSBURD, 2019; ZHANG; LI; HUANG; LI *et al.*, 2022). Embora ainda não seja bem conhecido os mecanismos pelos quais as células cancerígenas exercem tal influência sobre o metabolismo do hospedeiro, o aumento da disponibilidade sistêmica de glicose poderia induzir a maior captação de ^{18}F -FDG pelos miócitos cardíacos levando a uma confusão na interpretação da cardiotoxicidade.

De acordo com suas especificidades, o ^{18}F -FDG pode responder e auxiliar no entendimento dos mecanismos pelos quais as antraciclina induzem cardiotoxicidade bem como avaliar o efeito de possíveis tratamentos para amenizar, impedir ou restaurar a cardiotoxicidade (RISCHPLER; DIRSCHINGER; NEKOLLA; KOSSMANN *et al.*, 2016; WERNER, R. A.; CHEN, X.; ROWE, S. P.; LAPA, C. *et al.*, 2020).

Uma estratégia que tem sido usada para combater os efeitos adversos da quimioterapia no sistema cardiovascular dos pacientes com câncer de mama é o exercício aeróbico. Já é bem descrito que o treinamento físico aeróbico (TFA) promove um efeito cardioprotetor por diferentes mecanismos. Este treinamento reduz os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e estimula antioxidantes, reduz morte celular e estimula a síntese de miofilamentos (DUCHARME; GOERTZEN; PATTERSON; DEMETER, 2009). Não obstante, o TFA e o treino resistido tem a capacidade de regular a homeostase sistêmica da glicose e o transporte de glicose muscular esquelética, aumentar os níveis de insulina no sangue e estimular a captação de

glicose no tecido adiposo (EVANS; MCMILLIN; WEYRAUCH; WITCZAK, 2019). Além disso, estudos pré-clínicos e clínicos demonstraram que o TFA traz benefícios e previne os efeitos cardiotoxicos provocados pelas antraciclinas (CHEN, J. J.; WU, P.-T.; MIDDLEKAUFF, H. R.; NGUYEN, K.-L., 2017). No entanto, não se sabe ao certo todos os mecanismos pelos quais as antraciclinas induzem cardiotoxicidade. Além disso, ainda existe pouca informação sobre o papel que o exercício físico exerce em pacientes com câncer de mama.

Dessa forma, há uma necessidade de desenvolver novas técnicas que auxiliem no estudo de mecanismos associados à cardiotoxicidade pós-quimioterapia em modelo murino de câncer de mama, ou seja, em um modelo mais próximo do que ocorre em humanos. Ademais, considerando esse novo modelo experimental, há a necessidade de maiores estudos sobre os efeitos do TFA sobre a cardiotoxicidade.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Câncer de Mama

O câncer de mama destaca-se como a neoplasia maligna mais prevalente entre as mulheres, representando um aumento significativo global de morbidade e mortalidade. Anualmente, cerca de 2,3 milhões de mulheres são afetadas com essa condição, correspondendo a 11,7% de todos os diagnósticos de câncer e contribuindo para aproximadamente 685.000 mortes a cada ano (SUNG; FERLAY; SIEGEL; LAVERSANNE *et al.*, 2021). Em 2020, em países desenvolvidos foi registrado uma incidência de 88% mais alta do que a apresentada pelos países em desenvolvimento (55,9 e 29,7 por 100 mil mulheres, respectivamente). Esse cenário pode ser atribuído ao envelhecimento da população, ao aumento demográfico e aos fatores de risco associados aos estilos de vida ocidentais (<estimativa-2023.pdf> ; SUNG; FERLAY; SIEGEL; LAVERSANNE *et al.*, 2021) (DANTAS DE ARAÚJO SANTOS CAMARGO; DOS SANTOS; SIMÕES; CARVALHO *et al.*, 2021).

No Brasil, o número estimado de novos casos de câncer de mama para o triênio de 2023 a 2025, é de 73.610 casos (30,1% dos cânceres femininos). Esses dados resultam em um risco estimado de 66,54 novos casos a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, esse tipo de câncer também é o primeiro mais frequente nas mulheres das Regiões Sudeste (84,46/100 mil), Sul (71,44/100 mil), Centro-Oeste (57,28/100 mil) e Nordeste (52,20/100 mil). Na Região Norte, é o segundo tumor mais incidente (24,99/100 mil) (DA SILVA, 2020). Quanto à taxa de mortalidade, o Brasil registrou 17.825 óbitos por câncer de mama, equivalente a um risco de (16,47/100 mil) (SANTOS; LIMA; MARTINS; OLIVEIRA *et al.*, 2023).

Assim como outras neoplasias malignas, o câncer de mama engloba um grupo heterogêneo de doenças caracterizadas pelo crescimento celular desordenado, mutações genéticas, invasão de tecidos e potencial de metástase (BERTRAM, 2000; FENG; SPEZIA; HUANG; YUAN *et al.*, 2018). Existem diferentes subtipos de câncer de mama, que são classificados com base na imuno-histoquímica dos receptores de estrógeno (ER), progesterona (PR) e do receptor humano do fator de crescimento epidérmico 2 (HER-2) (BURGUIN; DIORIO; DUROCHER, 2021; FENG; SPEZIA; HUANG; YUAN *et al.*, 2018). Os quatro principais subtipos

moleculares do câncer de mama incluem o luminal A, luminal B, HER-2 e triplo negativo. Em destaque, o luminal B, corresponde a menos de 20%, caracterizado por apresentar crescimento um pouco mais rápido e o prognóstico pior que o luminal A (FENG; SPEZIA; HUANG; YUAN *et al.*, 2018).

O tratamento convencional com Doxo, muitas vezes efetivo no tratamento do câncer, provoca diversos efeitos adversos. Dentre os efeitos colaterais comuns, destacam-se alopecia, vômitos, perda de peso, erupções cutâneas e supressão da medula óssea. Os efeitos colaterais graves são hepatotoxicidade, eritema e ruptura de epitélio intersticial (RODRIGUES; COYLE; FÜZI; FERREIRA *et al.*, 2022). Além disso, a administração progressiva da Doxo, idade acima de 65 anos, sexo feminino, doença cardiovascular pré-existente e inclusão do coração no campo de radiação, são fatores que aumentam o risco de cardiotoxicidade (HAJJAR; COSTA; LOPES; HOFF *et al.*, 2020; JAIN; ARONOW, 2019; SESTIER; HILLIS; FRASER; LEONG, 2021). Não obstante, o uso associado de outros agentes cardiotóxicos como modeladores seletivos de HER (*Human Epidermal growth factor receptor*), receptores de estrogênio (Trastuzumabe e Pertuzumabe), antimetabólicos (5-fluorouracil, capecitabina), agentes da platina (Cisplatina), inibidores da tirosina quinase (lapatinibe, neratinibe, pirotinibe e tucatinibe), taxanos (paclitaxel e o docetaxel) e agente alquilante (ciclofosfamida) também aumentam o risco de cardiotoxicidade. Por fim, doses acumulativas de Doxo maiores que 400 mg/m² resultam em um aumento exponencial, com risco de cardiotoxicidade em até 50% a 700 mg/m² (HAJJAR; COSTA; LOPES; HOFF *et al.*, 2020).

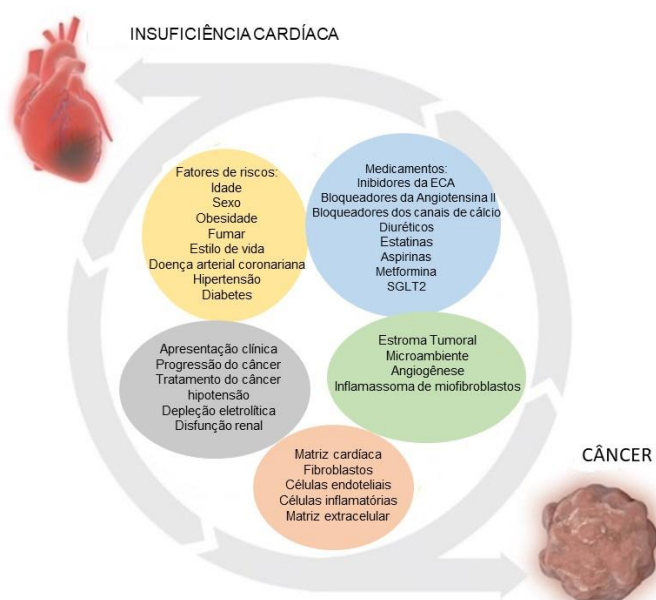
2.2 Doenças cardiovasculares e o câncer

As doenças cardiovasculares (DCV) são patologias comuns e graves, sendo consideradas uma das principais causas de mortalidade e incapacidade no Brasil e no mundo (ROSSI NETO; CASADEI; FINGER, 2020; ROTH; MENSAH; JOHNSON; ADDOLORATO *et al.*, 2020). As DCV estão aumentando em todo o mundo e sua prevalência quase duplicou de 271 milhões em 1990 para 523 milhões em 2019. Em consequência aos aumentos dos casos, o número de mortes por DCV elevou consideravelmente de 12,1 milhões em 1990 para 18,6 milhões em 2019 (ROTH; MENSAH; JOHNSON; ADDOLORATO *et al.*, 2020).

Atualmente, as DVC e o câncer, constituem duas das principais causas de morbimortalidade no mundo (RAPSOMANIKI; TIMMIS; GEORGE; PUJADES-RODRIGUEZ *et al.*, 2014). A relação entre as duas doenças graves é complexa, intrigante e envolve muitos componentes (Figura 1). Atualmente, estudos demonstraram que as DCV e o câncer estão relacionados com fatores de risco e mecanismos fisiopatológicos em comum. A presença do câncer pode levar à disfunção miocárdica e a presença da IC pode ser um fator de risco para o aumento da incidência de câncer (AUSONI; AZZARELLO, 2020; DE BOER; HULOT; TOCCHETTI; ABOUMSALLEM *et al.*, 2020; TOCCHETTI; AMERI; DE BOER; D'ALESSANDRA *et al.*, 2020).

As DVC e os cânceres são multifatoriais e possuem diversos fatores de riscos em comum, incluindo dislipidemia, obesidade, caquexia, idade, tabagismo, hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes mellitus (DM) e falta de atividade física (MEIJERS; DE BOER, 2019). Estes fatores de risco e comorbidades podem aumentar a mortalidade tanto a curto como a longo prazo (GIZA; ILIESCU; HASSAN; MARMAGKIOLIS *et al.*, 2017).

Figura 1: Complexa interação entre insuficiência cardíaca e câncer



Fonte: Adaptado de Wouter C Meijers, Rudolf A de Boer, 2019

Além dos fatores de risco comuns, o aumento do estado inflamatório é determinante para o surgimento e progressão do câncer e das DCV. As células cancerígenas podem produzir uma variedade de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, que além de promoverem a difusão de elementos pró-coagulantes no espaço extravascular, também podem promover danos endoteliais e aumentar a permeabilidade dos pequenos vasos sanguíneos (GIOVANNUCCI; HARLAN; ARCHER; BERGENSTAL *et al.*, 2010). Esse processo inflamatório é causado pelo acúmulo de partículas de colesterol nas paredes internas dos vasos sanguíneos, formando placas. Isto resulta num efeito pró-aterosclerótico, contribuindo para um estado pró-trombótico do câncer, aumentando o risco de doença arterial coronariana (DAC) em pacientes com câncer (GIZA; ILIESCU; HASSAN; MARMAGKIOLIS *et al.*, 2017).

A função principal do metabolismo celular consiste em garantir a obtenção de energia (Adenosina Trifosfato - ATP) necessária para suas funções e se proteger contra as reações metabólicas oxidativas (KARLSTAEDT; MOSLEHI; DE BOER, 2022). Os cardiomiócitos e as células cancerígenas são capazes de manter seu metabolismo celular mesmo em situações de estresse durante um período. Os miócitos cardíacos são capazes de suprir sua demanda metabólica utilizando ácidos graxos, que são preferidos em condições fisiológicas normais em relação a carboidratos e aminoácidos, para a geração de ATP. Porém, os cardiomiócitos são capazes de alterar o seu substrato energético em situações específicas como aumento de biodisponibilidade de carboidratos ou frente a redução da capacidade oxidativa mitocondrial de produção energética (TAEGTMEYER; YOUNG; LOPASCHUK; ABEL *et al.*, 2016).

Já a maioria das células cancerosas, apresentam altas taxas de captação de glicose e glicólise para manutenção de seu metabolismo. Foi identificado na década de 1920 que as células cancerosas tendem a metabolizar a glicose em lactato. Isso é conhecido como efeito Warburg, que consiste na captação de glicose pelas células no microambiente tumoral ou glicólise aeróbica (ZHANG; LI; HUANG; LI *et al.*, 2022). O câncer através de programas catabólicos complexos (inflamatório, estresse e lipólise) induz uma ativação da síntese hepática de glicose que redireciona a glicose não utilizada no músculo e adipócitos, alterando o metabolismo sistêmico da glicose no hospedeiro para fornecer glicose para o tumor. Isso gera, nos outros tecidos, e

potencialmente nos cardiomiócitos, uma substituição do metabolismo aeróbico celular para um metabolismo glicolítico anaeróbico levando a prejuízo celular energético, caquexia e que podem favorecer a progressão do câncer(SZABLEWSKI, 2013).

2.3 Doxorubicina

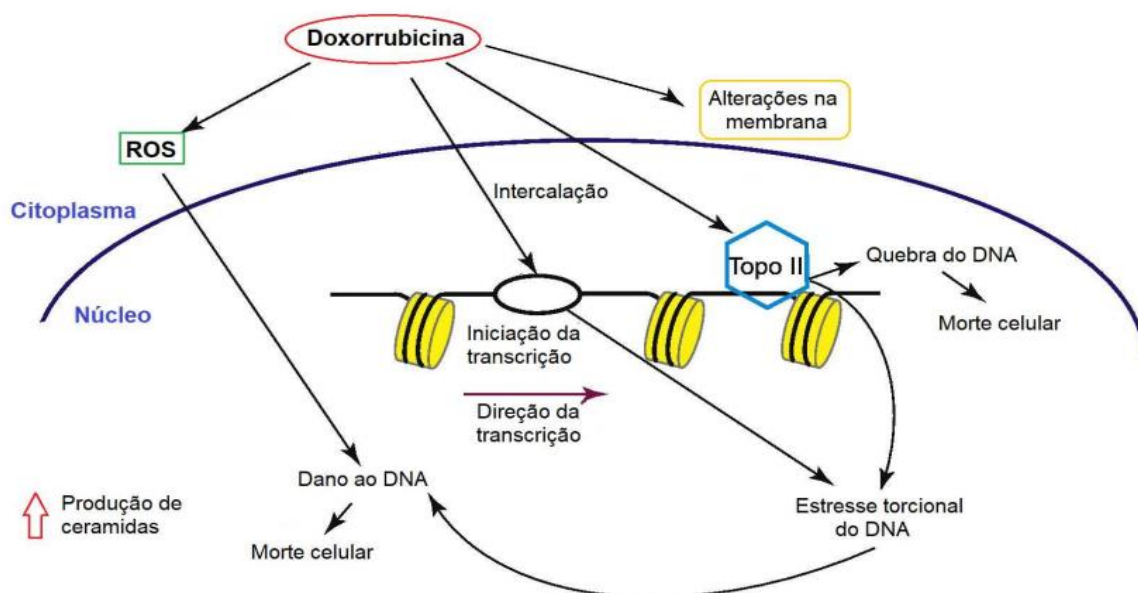
A Doxo, conhecida comercialmente como adriamicina, é um antibiótico da principal classe das antraciclinas, foi isolada pela primeira vez de uma cepa da bactéria *Streptomyces peucetius var. caesius*, na década de 1960 (KHASRAW; BELL; DANG, 2012). A Doxo teve seu uso aprovado pela *Food and drug administration* (FDA) dos Estados Unidos como um agente quimioterápico citotóxico eficaz para uma variedade de tumores sólidos e malignidades hematológicas. Entre eles, incluindo leucemias, sarcomas de tecidos moles e câncer de mama (AL-MALKY; AL HARTHI; OSMAN, 2020). Dessa forma, ela está presente na lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial da Saúde (OMS) (AL-MALKY; AL HARTHI; OSMAN, 2020; KHASRAW; BELL; DANG, 2012; WU; LEUNG; POON, 2022).

Embora seja um agente antitumoral bem estabelecido e comprovadamente eficaz contra a maioria das células tumorais, seu uso é limitado devido à sua natureza hidrofílica. A droga tem meia-vida curta e grande volume de distribuição, necessitando de altas doses para tratamento eficaz, levando a efeitos colaterais graves como a cardiotoxicidade que, dependendo da dose, pode ser letal (Peter, Alven, et al., 2022).

A Doxo é comercializada na forma de cloridrato e administrada por via endovenosa. A dose recomendada é de 50 a 75 mg/m², geralmente administrada em dose única com intervalo de 21 dias (YANG; TEVES; KEMP; HENIKOFF, 2014).

Apesar do seu extenso uso na clínica, os mecanismos de ação que causa a morte celular cancerígena não são bem compreendidos. Entretanto, as hipóteses mais aceitas envolvem a inibição da topoisomerase II (top II) e estresse oxidativo pela formação de radicais livres, levando a danos no desoxirribonucleico (DNA), e superprodução de ceramidas que levam à apoptose e morte celular via ativação da caspase-3 (Figura 2) (FABIANI; AIMO; GRIGORATOS; CASTIGLIONE *et al.*, 2021; YANG; TEVES; KEMP; HENIKOFF, 2014).

Figura 2: Principais mecanismos causadores de morte celular mediada por Doxo



Fonte: Adaptado de (YANG; TEVES; KEMP; HENIKOFF, 2014).

Embora eficaz, o uso clínico de Doxo está associado a vários efeitos colaterais sistêmicos, o que limita o seu uso principalmente devido aos efeitos cardíacos.(CHOKSEY; TIMM, 2021). Embora esteja associada a uma série de complicações cardiovasculares agudas, estas são geralmente leves e transitórias. No entanto, uma vez diagnosticada a IC, a cardiotoxicidade pode cursar com complicações graves a longo prazo, com uma taxa de mortalidade de 60% (SOBCZUK; CZERWIŃSKA; KLEIBERT; CUDNOCH-JĘDRZEJEWSKA, 2022; WU; LEUNG; POON, 2022).

2.4 Cardiotoxicidade

O uso da Doxo para o tratamento oncológico se iniciou em 1967 (HAJJAR; COSTA; LOPES; HOFF *et al.*, 2020). Já nos anos 70, surgiram os primeiros relatos sobre seus efeitos relacionados a toxicidade cardíaca, ao dano progressivo do coração, o qual poderia ser irreversível e até mesmo levar à morte dos cardiomiócitos. Neste período, já se pensava em uma possível relação destes efeitos com a dose de Doxo (WU; LEUNG; POON, 2022). Estudos clínicos atuais demonstram que a identificação precoce e o início do tratamento cardioprotetor resultaram em

recuperação parcial em 82% dos pacientes e recuperação total em 11% dos casos de danos cardíacos. Em resumo, realizar o rastreamento precoce e a intervenção imediata aumentam a probabilidade de melhoria dos efeitos prejudiciais da cardiotoxicidade (DEMPKE; ZIELINSKI; WINKLER; SILBERMAN *et al.*, 2023).

A cardiotoxicidade é um dos efeitos adversos mais graves relacionados a quimioterapia, sendo definida como a redução na fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) superior ou igual a 10% em pacientes assintomáticos ou mais de 5% em pacientes sintomáticos para um valor abaixo do limite inferior da normalidade de 50%(HAJJAR; COSTA; LOPES; HOFF *et al.*, 2020).

Os possíveis mecanismos de lesão nos cardiomiócitos são a redução de elétron produzindo ROS, ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. O estresse oxidativo é promovido através da reação de ROS com ferro (Fe^{2+} e Fe^{3+}) que produz o radical hidroxila altamente tóxico, causando danos ao DNA, proteínas e levando à morte celular. Outro mecanismo é o aumento da concentração intracelular de ferro, através da inibição da proteína reguladora do ferro – 1 (IRP-1). A inibição da expressão de IRP-1 leva ao aumento dos níveis intracelulares de ferro, gerando um aumento dos níveis intracelulares de ferro e do estresse oxidativo (KONG; GUO; SONG; ZHANG *et al.*, 2022).

A cardiotoxicidade induzida pela Doxo pode ocorrer em qualquer estágio do tratamento oncológico e é dividida em duas categorias: aguda ou crônica (SONGBO; LANG; XINYONG; BIN *et al.*, 2019). Estima-se que até 30% dos pacientes submetidos a esse tratamento antitumoral manifestem alterações sistêmicas. A cardiotoxicidade aguda pode ser detectada dentro de 24 horas ou até quatorze dias após a interrupção do tratamento oncológico, comprovada por eletrocardiograma (ECG), mostrando alterações atípicas do segmento ST, anormalidades na repolarização ventricular e prolongamento da duração do intervalo QT, diminuição da voltagem do QRS, taquicardia ou batimentos supraventriculares prematuros. A cardiotoxicidade aguda presente em pacientes submetidos ao tratamento com Doxo pode ser controlada clinicamente e os efeitos cardiotóxicos são reversíveis. Essas alterações geralmente podem ser resolvidas espontaneamente ou impedir a continuação do tratamento quimioterápico (DEMPKE; ZIELINSKI; WINKLER; SILBERMAN *et al.*, 2023; SONGBO; LANG; XINYONG; BIN *et al.*, 2019).

A cardiotoxicidade crônica está associada à disfunção miocárdica progressiva de semanas a meses após a administração do anticancerígeno, apresentando manifestações precoces e tardias. A mesma pode ocorrer durante a quimioterapia ou no primeiro ano após o término. É tipicamente caracterizada pelo desenvolvimento de disfunção sistólica do ventrículo esquerdo, levando a cardiomiopatia dilatada e IC (DEMPKE; ZIELINSKI; WINKLER; SILBERMAN *et al.*, 2023).

A dose total acumulada é um importante fator de risco para efeito tóxico da Doxo sobre os cardiomiócitos. A dose cumulativa de eventos cardíacos foi estimada em 32%, 54% e 64% para acúmulos de Doxo de 400, 500 e 550mg/m, respectivamente (CHOKSEY; TIMM, 2021; Dempke; Zielinski; Winkler; Silberman *et al.*, 2023; Liu, 2020).

Sinais e sintomas de IC como dispneia e fadiga, podem indicar a instalação da cardiotoxicidade. Entretanto, os sinais e sintomas apresentados por estes pacientes podem ser confundidos pela própria apresentação clínica do câncer (Cardinale; Colombo; Lamantia; Colombo *et al.*, 2010).

Atualmente, o diagnóstico da cardiotoxicidade é confirmado através da medição de enzimas cardíacas ou fatores humorais, como troponina I e T. O peptídeo natriurético tipo B, pode ser uma estratégia adicional para identificar sinais de danos ao coração causados pela Doxo. No entanto, esses marcadores indicam lesões gerais no tecido cardíaco. Por outro lado, o uso de marcadores específicos de dano cardíaco em conjunto com técnicas de imagem pode aumentar a sensibilidade na detecção de cardiomiopatia (Hajjar; Costa; Lopes; Hoff *et al.*, 2020).

A utilização de biomarcadores embora pareça ter bom valor prognóstico e indique lesão tecidual (Salvatici; Cardinale; Spaggiari; Veglia *et al.*, 2010), (Zamorano; Lancellotti; Rodriguez Munoz; Aboyans *et al.*, 2016), ainda não há evidências que embasem a mudança de condutas clínicas dependendo de seus resultados (Schwartz; Jain; Storozynsky, 2013). Além disso, a biópsia endomiocárdica embora seja altamente sensível e específica, é altamente invasiva e expõe os pacientes a riscos associados ao exame (De Oncologia Clínica; De Medicina; Kalil Filho; Hajjar *et al.*, 2011).

Nas últimas décadas, os métodos de imagem para a avaliação de parâmetros funcionais e estruturais cardíacos têm sido amplamente utilizados para o

monitoramento e detecção da cardiotoxicidade. Neste contexto, a FEVE, dentre os parâmetros mensuráveis, é a variável chave para a avaliação do remodelamento miocárdico, grau de disfunção ventricular e prognóstico da doença miocárdica (ERIC; SLOGGETT; IWANOCHKO; RAKOWSKI *et al.*, 2000).

O ecocardiograma tem sido amplamente utilizado para a avaliação da função ventricular em humanos e em modelos de cardiopatia por ser uma ferramenta de baixo custo, rápida obtenção das imagens e não necessitar de isótopos radioativos. Entretanto, a avaliação ecocardiográfica é altamente avaliador-dependente e com limitada reprodutibilidade interobservador, limitando assim, a detecção de alterações discretas (OLIVEIRA; O'CONNELL; CARVALHO; PULICI *et al.*, 2017). A ventriculografia radioisotópica (VRI) é uma técnica frequentemente utilizada na prática clínica, demonstrando boa acurácia e níveis elevados de reprodutibilidade em avaliações seriadas para a quantificação da FEVE na avaliação da cardiotoxicidade (ARMSTRONG; PLANA; ZHANG; SRIVASTAVA *et al.*, 2012; BOELLAARD; DELGADO-BOLTON; OYEN; GIAMMARILE *et al.*, 2015; OLIVEIRA; O'CONNELL; CARVALHO; PULICI *et al.*, 2017; YU; SLOGGETT; IWANOCHKO; RAKOWSKI *et al.*, 2000). Entretanto, a técnica não possui ampla disponibilidade e necessita de radiação ionizante.

Da mesma forma, a ressonância magnética cardíaca também permite a avaliação precisa dos volumes cavitários e da função miocárdica, além de auxiliar nos casos em que há dúvidas da etiologia da miocardiopatia (CHEN, J. J.; WU, P.-T.; MIDDLEKAUFF, H. R.; NGUYEN, K.-L., 2017). Porém, igualmente possui disponibilidade reduzida de utilização especialmente em países em desenvolvimento.

As técnicas de imagens estabelecidas na monitorização e detecção da cardiotoxicidade são baseadas na avaliação funcional e estrutural miocárdica e não capazes de detectar fenômenos biológicos que antecedem a lesão miocárdica como o processo inflamatório, alterações do metabolismo dos miócitos, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, sobrecarga de cálcio e apoptose celular (STURGEON; SCHADLER; MUTHUKUMARAN; DING *et al.*, 2014).

Além das técnicas de imagens utilizadas para a monitorização e detecção de cardiotoxicidade, temos a tomografia emissão de pósitrons (PET), que é rotineiramente utilizada para o estadiamento, reestadiamento e monitoramento

terapêutico de vários tipos de câncer e tem sido estudado para avaliação de alterações miocárdicas.

2.5 Imagem de tomografia por emissão de pósitrons (PET)

O PET é uma tecnologia desenvolvida para a aquisição de imagem analítica utilizando compostos marcados com radioisótopos emissores de pósitrons, capaz de gerar imagens moleculares com boa resolução e alta sensibilidade (JAMAR; BUSCOMBE; CHITI; CHRISTIAN *et al.*, 2013). É um exame de diagnóstico não invasivo que fornece informações quantitativas para avaliar processos metabólicos e biológicos em níveis celulares e moleculares em mamíferos *in vivo* (BOELLAARD; DELGADO-BOLTON; OYEN; GIAMMARILE *et al.*, 2015).

As imagens PET tem sido frequentemente utilizadas para rastreamento, avaliação e estadiamento de cânceres devido à sua capacidade de fornecer avaliação quantitativa, superior sensibilidade de detecção, melhor resolução espacial e temporal com relação a outras técnicas de medicina nuclear. Atualmente essa técnica tem ganhado espaço na área da cardiologia com o objetivo de avaliar a perfusão miocárdica (SCHELBERT; PHELPS; HUANG; MACDONALD *et al.*, 1981; UREN; MELIN; DE BRUYNE; WIJNS *et al.*, 1994), inervação autonômica cardíaca (SCHWAIGER; KALFF; ROSENSPIRE; HAKA *et al.*, 1990) e consumo de substrato energético miocárdico (KNUUTI; SCHELBERT; BAX, 2002; TILLISCH; BRUNKEN; MARSHALL; SCHWAIGER *et al.*, 1986).

Para a aquisição das imagens PET é utilizada um fármaco marcador combinado com um isótopo emissor de pósitrons (β^+) conhecido como radiofármaco. Dessa forma, a biodistribuição *in vivo* e a especificidade da imagem está relacionada com a natureza do radiotraçador utilizado (ALCANTARA; LEAL; GARCÍA-BOCANEGRA; GARCÍA-MARTÍN, 2014). Os principais componentes do PET são cristais de cintilação e um fotossensor. No PET scanner são usados principalmente os cristais de cintiladores de silicato de lutécio dopados com cério oxioortossilicato de lutécio (LSO) e oxioortossilicato de lutécio e ítrio (LYSO) (MOODY; LEE; CORBETT; FICARO *et al.*, 2015). O radiofármaco injetado é capaz de emitir pósitrons, que ao encontrar elétrons presentes no tecido alvo sofrem um processo chamado de aniquilação. Neste processo, é emitindo dois raios gama de 511 KeV de energia em

direção oposta. Estes fótons, são detectadas pelo anel de receptores de cristais posicionados a 360° ao redor do alvo (MILLER; LONG; VILAR; GEE, 2008). A partir de algoritmos específicos, as imagens do órgão alvo são processadas e reconstruídas tridimensionalmente.

O uso do PET tem aumentado consideravelmente nos últimos anos tanto em modelo experimental quanto no cenário clínico contribuindo significativamente para avançar o entendimento dos mecanismos e da fisiopatologia de diversas doenças e na pesquisa clínica. Dentre elas, destacam-se as doenças cardíacas (OSIECKI; STERLIŃSKI; MARCINIAK-EMMONS; DZIUK, 2021), oncológicas (ROY; WHITEHEAD; LI; ADEMUYIWA *et al.*, 2022) e neurológicas (CHEVIN; CHABRIER; DINOMAIS; BEDELL *et al.*, 2020).

2.6 Fluordesoxiglicose (¹⁸F-FDG)

O ¹⁸F-FDG, molécula análoga da glicose, é o radiofármaco mais frequentemente utilizado como marcador molecular para o estadiamento, reestadiamento e monitoramento terapêutico de vários tumores (WERNER, RUDOLF A; CHEN, XINYU; ROWE, STEVEN P; LAPA, CONSTANTIN *et al.*, 2020). Além disso, esse radiofármaco é amplamente utilizado na cardiologia, pois permite a avaliação da viabilidade do miocárdio. Os primeiros estudos com FDG, foi documentado na primeira metade da década de 70 em conjunto com alguns compostos rotulados como ¹⁵O, ¹³N, ¹¹C e ¹⁸F. (BASU; HESS; NIELSEN BRAAD; OLSEN *et al.*, 2014).

O ¹⁸F-FDG é absorvido pelo meio intracelular pelos transportadores de glicose (GLUTs), seguido de fosforilação pela hexoquinase para formação de ¹⁸F-FDG-6-fosfato. (BASU; HESS; NIELSEN BRAAD; OLSEN *et al.*, 2014). Dessa forma, essa molécula é aprisionada na célula e quando a expressão de GLUTs aumenta no tecido, a captação de ¹⁸F-FDG se eleva permitindo assim, a obtenção de imagens PET do metabolismo glicolítico regional (NELSON; WANG; LEAV; CRANE, 1996; YAMADA; UCHIDA; KWANG-LEE; KITAMURA *et al.*, 2012).

Após a aquisição da imagem, a análise dela reflete o metabolismo da glicose *in vivo*. A captação do FDG é frequentemente quantificada por valores de captação padronizado através de um biomarcador de imagem confiável que é o SUV, do inglês *standardized uptake value* (MEYER; WIENKE; SUROV, 2019). A medida do SUV é

realizada através dos valores obtidos da radioatividade da região de estudo e a dose de radiação injetada corrigida pelo peso do paciente. Um ROI, do inglês (*regions of interest*), é desenhado então na região de interesse por todo miocárdio a ser analisado. Em geral, as regiões estudadas são o septo interventricular, paredes do ventrículo esquerdo e ventrículo direito, gerando um valor de SUV (VAQUERO; KINAHAN, 2015).

Portanto, como mencionado anteriormente, em condições fisiológicas os miócitos cardíacos utilizam ácidos graxos preferencialmente para a geração de ATP em relação a carboidratos e aminoácidos (TAEGTMEYER; YOUNG; LOPASCHUK; ABEL *et al.*, 2016). Entretanto, como consequência da cardiotoxicidade gerada pelas antraciclinas e consequente disfunção mitocondrial, acredita-se que há uma substituição do metabolismo aeróbico por metabolismo anaeróbico glicolítico (LEI; WANG; SHELDON; SUN *et al.*, 2023). Dessa forma, acredita-se que o aumento da captação de ^{18}F -FDG em indivíduos submetidos à quimioterapia possa ser um marcador precoce de cardiotoxicidade (BECKER; ARRUDA; BERENQUER; BURIL *et al.*, 2023).

2.7 Redução de capacidade funcional

Baixos níveis de aptidão cardiorrespiratória estão associados a alto risco de doenças DVC e estão relacionados com a mortalidade de alguns tipos de câncer (ROSS; BLAIR; ARENA; CHURCH *et al.*, 2016). Além disso, boa aptidão cardiorrespiratória está relacionada com a redução da mortalidade (KOKKINOS; FASELIS; SAMUEL; PITTARAS *et al.*, 2022). Vale ressaltar que aptidão cardiorrespiratória é um importante preditor para avaliação da saúde cardiovascular na infância, adolescência e vida adulta (HENRIKSSON; HENRIKSSON; TYNELIUS; EKSTEDT *et al.*, 2020). O nível de aptidão cardiorrespiratória é expresso pelos equivalentes metabólicos (METs). 1 MET = 3,5mL O_2 / Kg/min, esses equivalentes estão relacionados com o risco de DAC. A cada 1 MET aumentado a taxa de mortalidade reduz em aproximadamente ~ 16%, aumentando a expectativa de vida e reduzindo as taxas de DVC (FRANKLIN; EIJSVOGELS; PANDEY; QUINDRY *et al.*, 2022).

Pacientes com câncer de mama apresentam menor capacidade cardiorrespiratória quando comparadas a mulheres saudáveis antes do tratamento adjuvante (PEEL; THOMAS; DITTUS; JONES *et al.*, 2014). Além disso, pode ser observada redução média do VO₂ pico em 10% após o tratamento com quimioterápicos (PEEL; BARLOW; LEONARD; DEFINA *et al.*, 2015; VAN DER SCHOOT; ORMEL; WESTERINK; MAY *et al.*, 2022; WIESTAD; RAASTAD; NORDIN; IGELSTROM *et al.*, 2020).

Com isso, o exercício físico é cada vez mais recomendado como uma abordagem não farmacológica para minimizar os efeitos adversos do tratamento com Doxo.

2.8 Exercício Físico

O Exercício físico foi identificado como uma promissora abordagem não farmacológica para prevenir os efeitos causados pelo tratamento quimioterápico com a Doxo (SANTOS-ALVES; RIZO-ROCA; MARQUES-ALEIXO; COXITO *et al.*, 2019). O exercício físico influencia modificações epigenéticas associadas a doenças cardiovasculares, envolvendo uma série de enzimas, metabólitos e vias de sinalização. Dentre essas modificações estão a fibronectina tipo III contendo domínio 5 (GNDC5), miosina, FGF21 e osteocrina, que estão relacionadas à diminuição significativa do apoptose e do dano oxidativo em cardiomiócitos (WU; ZHANG; GAO, 2021). Além disso, o exercício contínuo e permanente antes e durante o tratamento com a Doxo, pode melhorar a função mitocondrial e prevenir o desequilíbrio da homeostase redox e danos mitocondriais através da regulação positiva de SIRT3 e da regulação negativa de p66shc que estão relacionadas a um fenótipo protetor mitocondrial (LI; YANG; WANG; HE *et al.*, 2021).

O exercício físico tem ganhado cada vez mais importância na oncologia devido a seus inúmeros benefícios como a melhora da qualidade de vida e reduzindo os sintomas e efeitos colaterais do tratamento oncológico. Do mesmo modo, o exercício parece reduzir o risco de recidiva (CAMPOS; FEITOSA; MIZZACI; FLACH *et al.*, 2022), evita o aumento do peso corporal (ROCK; THOMSON; SULLIVAN; HOWE *et al.*, 2022), função cognitiva (KOEVOETS; SCHAGEN; DE RUITER; GEERLINGS *et*

al., 2022), além de aumentar a expectativa de vida (DE BOER; WÖRNER; VERLAAN; VAN LEEUWEN, 2017).

Atualmente as recomendações de exercícios para sobreviventes de câncer, sugerem o treinamento aeróbico de intensidade moderada de 150–300 min/semana ou em intensidade vigorosa de 75–150 min/semana, ou uma combinação equivalente de ambas. Igualmente é recomendado o treinamento de resistência 2 ou 3 vezes por semana para os principais grupos musculares (50-70% de uma repetição máxima-1 RM), e mobilidade articular realizada 2-3 vezes por semana (TRANCHITA; MURRI; GRAZIOLI; CERULLI *et al.*, 2022).

O treinamento aeróbico promove um efeito cardioprotetor por diferentes mecanismos. Este treinamento reduz os níveis de ROS, estimula anti-oxidantes, reduzem morte celular e estimula a síntese de miofilamentos (DUCHARME; GOERTZEN; PATTERSON; DEMETER, 2009). Estudos pré-clínicos e clínicos já demonstraram que o exercício aeróbico traz benefícios e ameniza os efeitos cardiotoxícos provocados pelas antraciclinas (CHEN, J. J.; WU, P.-T.; MIDDLEKAUFF, H. R.; NGUYEN, K.-L., 2017).

Estudos experimentais mostraram o papel do treinamento físico como uma estratégia contra os efeitos colaterais do tratamento quimioterápico, sendo capaz de reduzir a disfunção cardíaca (FOULKES; HOWDEN; HAYKOWSKY; ANTILL *et al.*, 2023). Entretanto, são necessário novos estudos para um melhor entendimento dos benefícios do treinamento físico e em qual fase do tratamento com Doxo o treinamento terá um efeito melhor.

2.9 Modelo Animal

Na última década, o tratamento oncológico tem evoluído consideravelmente, e muitos pacientes com câncer de mama estão sobrevivendo ao prognóstico de câncer. Claramente, a introdução de novas drogas, tem melhorado e elevando a taxa de sobrevivência das mulheres diagnósticas com câncer de mama, entretanto essas terapias são citotóxicas resultando em agravos cardíacos como a cardiotoxicidade e em muitos casos evoluindo para morte. Porém, ainda não é claro quais são os mecanismos causadores da cardiotoxicidade (ANAND; DEY; CHANDEL; SANYAL *et*

al., 2023). Diante dos efeitos cardiotoxíco do tratamento oncológico, torna - se importante o estudo para compreender os mecanismos da cardiotoxicidade.

Os modelos murinos são rotineiramente utilizados para reproduzir doenças humanas, tornando um componente importante para as pesquisas pré - clínicas. Os camundongos apresentam uma semelhança anatômica e fisiológica com a do ser humano quando comparado com outros modelos. Além disso, são importantes para entender processos e vias biológicas relacionados ao metabolismo, estresse e progressão da doença, permitindo assim uma investigação detalhada da patologia (ROSENTHAL; BROWN, 2007).

Alguns modelos de cardiotoxicidade já foram descritos na literatura; no entanto, as doses e os intervalos descritos variam e dependem do tipo de cardiotoxicidade aguda ou crônica que se deseja desenvolver. Alguns autores realizam a administração da Doxo uma vez na semana, com o objetivo de desenvolver um modelo crônico (DESAI; VIJAY; LEE; HAN *et al.*, 2022) e outros uma única dose com o objetivo de desenvolver um modelo agudo (LI; SUNG; HUANG; YANG *et al.*, 2006). A dose injetada via intraperitoneal acumulativas variam de entre 10mg/Kg a 25 mg/Kg e via intravenosa de 10mg/ Kg ou 15mg/Kg ou 25mg/Kg no modelo crônico (MENG; FAN; WANG; WANG *et al.*, 2022). Da mesma maneira, existem duas formas de administração, via intravenosa e via intraperitoneal. Ambas induzem a cardiotoxicidade, porém apresentam alguns efeitos colaterais. Com na administração via intravenosa podem ocorrer flebite, morte tecidual da cauda, além de ser uma técnica difícil. Já a via intraperitoneal é uma técnica simples, mas com grande mortalidade devido ao risco de lesão peritoneal, peritonite e ascite. Vale ressaltar que o tratamento em humanos é realizado via intravenosa.

3. JUSTIFICATIVA

Todos os anos, 2,3 milhões de mulheres são diagnosticadas com câncer de mama, uma das principais causas de morbidade e mortalidade nesta população em todo o mundo (SANTOS; LIMA; MARTINS; OLIVEIRA *et al.*, 2023). Por outro lado, nas últimas décadas o tratamento do câncer tem sofrido grandes avanços o que tem levado ao aumento na taxa de sobrevivência desses pacientes (ALTER, B. P.; GIRI, N.; SAVAGE, S. A.; PETERS, J. A. *et al.*, 2010; STURGEON, K. M.; KY, B.; LIBONATI, J. R.; SCHMITZ, K. H., 2014). No entanto, o aumento na taxa de sobrevivência tem gerado maior preocupação com os eventos secundários ao tratamento do câncer (CHEN, J. J.; WU, P.-T.; MIDDLEKAUFF, H. R.; NGUYEN, K.-L., 2017; PATNAIK, J. L.; BYERS, T.; DIGUISEPPI, C.; DABELEA, D. *et al.*, 2011; YOOD; WELLS; ALFORD; DAKKI *et al.*, 2012).

A doença cardiovascular provocada pelo uso de agentes quimioterápicos tem sido a causa mais comum da morte de pacientes com câncer de mama que sobreviveram por mais de nove anos após o tratamento (CHEN, J. J.; WU, P. T.; MIDDLEKAUFF, H. R.; NGUYEN, K. L., 2017). No entanto, os mecanismos envolvidos na cardiotoxicidade associada a esses agentes quimioterápicos, ainda não foram totalmente elucidados (GINSBURG; BRAY; COLEMAN; VANDERPUYE *et al.*, 2017).

Nas últimas décadas, o exercício aeróbico tem sido utilizado como uma estratégia potencial não farmacológica para combater os efeitos adversos da quimioterapia no sistema cardiovascular dos pacientes com câncer. No entanto, para melhor padronização dessa técnica e compreensão dos mecanismos associados é necessário o desenvolvimento de modelo pré-clínico adequado e o uso de técnicas não invasivas para acompanhamento da evolução desses animais. Portanto, a proposta inovadora deste projeto é o desenvolvimento de modelo murino de cardiotoxicidade em camundongos com tumor de mama e a utilização de imagens PET como ferramenta chave para o estudo dos mecanismos associados, assim como avaliação dos benefícios do exercício aeróbico sobre a cardiotoxicidade.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Caracterizar um modelo pré-clínico de cardiotoxicidade em animais com câncer de mama e avaliar o efeito cardioprotetor do TFA sobre os mecanismos associados a cardiotoxicidade decorrente da quimioterapia.

4.2 Objetivos Específicos

1- Caracterizar um modelo pré-clínico de cardiotoxicidade em animais com câncer de mama para o estudo dos efeitos adversos da quimioterapia, e compreender as alterações funcionais, estruturais e histológicas miocárdicas;

2- Avaliar os efeitos da quimioterapia sobre o metabolismo miocárdico e função miocárdica de camundongos com tumor de mama utilizando o ^{18}F -FDG;

3- Identificar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na cardiotoxicidade através da avaliação histológica do estresse oxidativo e da inflamação;

4- Avaliar o efeito do TFA sobre a cardiotoxicidade;

5- Avaliar o efeito do TFA sobre a capacidade funcional em modelo de cardiotoxicidade

6- Avaliar o efeito do TFA sobre o estresse oxidativo e a inflamação miocárdica.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6J isogênicos, fêmeas com 8 semanas de vida, peso aproximado de 20 gramas adquiridos do Biotério Central da UFMG, distribuídos aleatoriamente em grupos experimentais de acordo com o protocolo de estudo. Os animais foram mantidos em alojamento climatizado no Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear da Comissão Nacional de Energia Nuclear (CDTN - CNEN, Belo Horizonte - MG), com livre acesso a água e alimento (ração labina irradiada - Presence), temperatura controlada (23 – 24°C) e luminosidade com ciclo de 12 horas de luz/sombra. Todos os experimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (número de protocolo 51/2022).

Os animais foram submetidos aos procedimentos sob anestesia, de forma a não induzir estresse ou dor. Em todo experimento com indução anestésica, a córnea dos animais foi protegida do ressecamento e trauma, por meio do uso de gel oftálmico (VIDISIC gel bausch + lomb 10 mg) desde o início da anestesia (YANG; TEVES; KEMP; HENIKOFF, 2014). Não foram utilizados métodos cruentos ou que submetesse os animais a sofrimento. Em caso de aumento do tempo de sono, desidratação, piloereção, postura encurvada, isolamento do resto do grupo e gritos ao serem tocados, o animal seria eutanasiado por deslocamento cervical após anestesia com xilazina/Ketamina. Para os exames de PET, os animais não foram mantidos em jejum porque a manipulação metabólica dos cardiomiócitos foi realizada através do anestésico utilizado e, somente a ração foi retirada 60 minutos antes da imagem para reduzir o risco de broncoaspiração durante a anestesia. Os animais foram climatizados no ambiente por pelo menos 1 semana antes de iniciar os experimentos.

Os animais foram manuseados por apenas dois pesquisadores para reduzir riscos de estresse ao animal, os experimentos foram realizados sempre no mesmo horário do dia para manter o ritmo circadiano dos animais, pois o mesmo se relaciona com vários parâmetros fisiológicos e metabólicos e o objetivo foi minimizar variáveis.

Os tumores de mama frequentemente são mais acometidos em mulheres, por isso o tumor de mama foi induzido em fêmeas por um único pesquisador e a escolha

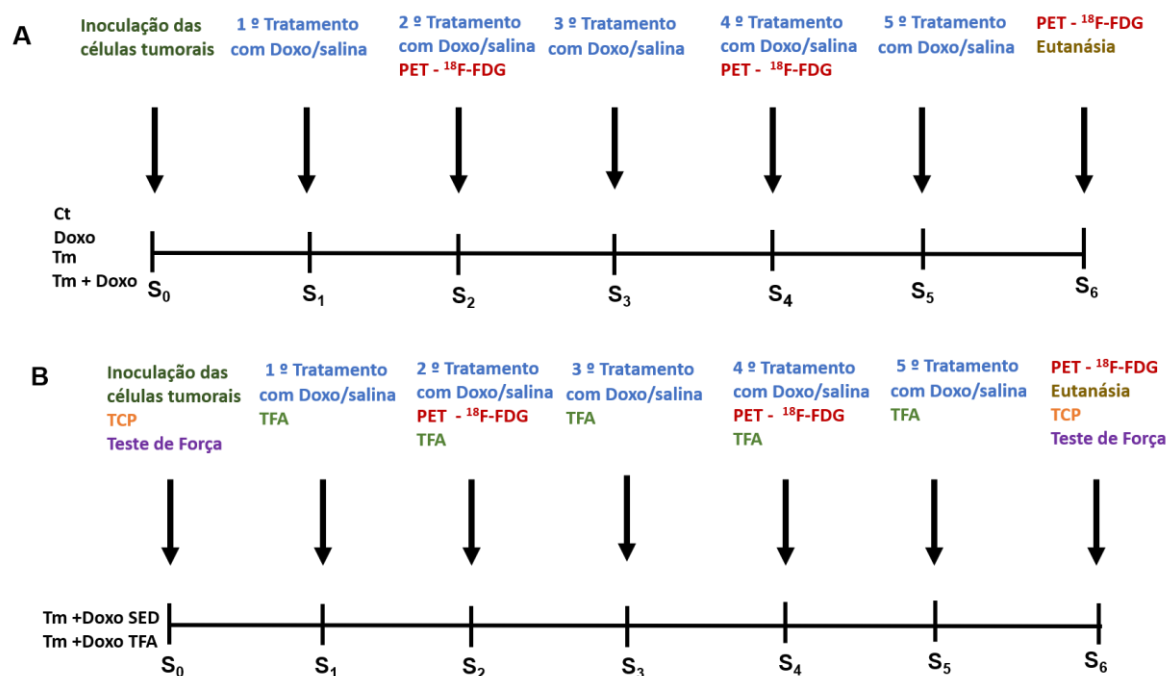
de usar células da linhagem E0771 foi por serem classificadas como luminal B (ER+, PR+/-, HER+), subtipo mais frequente de câncer de mama em humanos.

5.2 Delineamento geral do estudo

O estudo foi conduzido em etapas distintas, conforme detalhado nos seguintes itens dos materiais e métodos. Inicialmente, os animais foram divididos em quatro grupos: grupo controle (Ct), grupo Doxo (Doxo), grupo tumor (Tm) e grupo Tumor+Doxo (Tm+ Doxo). O protocolo iniciou com a inoculação das células tumorais E0771 ou inoculação com igual volume de salina (semana inicial, S0). Após 7 dias da inoculação das células, os animais foram submetidos ao tratamento com Doxo ou salina, uma vez por semana por cinco semanas. Sete dias após o primeiro tratamento, os animais foram submetidos a exame de imagem para avaliar metabolismo e função miocárdica no MicroPET com ^{18}F -FDG. Os animais foram submetidos aos métodos de imagens na semana 2 (S2), semana 4 (S4) e semana 6 (S6) (figura 3 - A). Ao final do período de experimento, os animais foram submetidos à eutanásia para a retirada do coração para a quantificação da intensidade de inflamação e estresse oxidativo através da análise histológica.

Para avaliar o efeito cardioprotetor do TFA, um novo grupo de animais foi submetido ao mesmo protocolo acima mencionado acrescido do teste de esforço cardiopulmonar (TCP) e do tratamento através TFA em concomitância com a doxo. Os animais foram submetidos ao mesmo exame de imagem para avaliar metabolismo e função miocárdica nas mesmas janelas temporais (S2, S4 e S6). Para avaliar a capacidade de exercício, foi realizado o TCP para avaliar a capacidade aeróbica. A força muscular foi avaliada através do teste de preensão muscular (48h após o TCP). Após as avaliações, e em concomitância ao tratamento com doxo, foi iniciado o TFA, 4 vezes por semana, durante 5 semanas com intensidade de 40% (S1 e S2) e 50% (S3, S4 e S5) da velocidade máxima atingida no TCP (GOMES-SANTOS; JORDÃO; PASSOS; BRUM *et al.*, 2021) (figura 3 -B). Ao final do período de experimento os animais foram submetidos à eutanásia, para a retirada do coração para a quantificação da intensidade de inflamação e estresse oxidativo através da análise histológica.

Figura 3 - Desenho experimental da caracterização do modelo de cardiotoxicidade em animais com câncer de mama e da avaliação do efeito cardioprotetor do TFA.



(A) - Após a inoculação por células ou salina, os animais foram acompanhados por seis semanas divididos em quatro grupos (Controle, Doxo, Tumor e Tumor+Doxo). Os animais foram tratados com Doxo ou salina uma vez por semana totalizando 5 doses e as imagens positrônicas foram realizadas na S₂, S₄ e S₆. **(B)** - Após a inoculação por células, os animais foram tratados com Doxo (5 doses), associado ou não ao TFA durante 5 semanas. Os animais foram divididos em dois grupos (Tumor+Doxo SED e Tumor+Doxo TFA). As imagens positrônicas foram realizadas na S₂, S₄ e S₆. ¹⁸F-FDG= Fluorodesoxiglicose marcado com Flúor 18; PET= Tomografia computadorizada por emissão de pósitrons; TCP= teste de esforço cardiopulmonar; TFA= treinamento físico aeróbico; SED= sedentário.

5.3 Grupos Experimentais

Para atingir os objetivos propostos, os animais foram divididos aleatoriamente em grupos experimentais, conforme a seguir.

Primeira etapa:

A primeira etapa do projeto consistiu na padronização do modelo murino de cardiotoxicidade em camundongos com tumor de mama EO771. Para isso, os animais foram divididos em quatro grupos experimentais:

Grupo Controle (Ct) – Animais saudáveis (n=9)

Grupo Doxo (Doxo) - Animais saudáveis tratados com Doxo (n=10)

Grupo Tumor (Tm) – Animais que foram inoculados células tumorais EO771 (n=5)

Grupo Tumor+Doxo (Tm+Doxo) – Animais que foram inoculados células tumorais e tratados com Doxo (n=14)

Segunda etapa:

A segunda etapa consistiu na avaliação dos mecanismos associados ao efeito do treinamento físico aeróbico (TFA) na cardiotoxicidade provocada pelo tumor e/ou tratamento com Doxo. Nesta etapa os animais foram divididos em dois grupos:

Grupo Tumor+Doxo SED (Tm+Doxo SED) – Animais que foram inoculados células tumorais EO771 e tratados com Doxo (n=14)

Grupo Tumor+Doxo TFA (Tm+Doxo TFA) – Animais que foram inoculados células tumorais EO771, tratadas com Doxo e submetidos ao TFA (n=12)

5.4 Cultura de Células

O modelo murino de tumor de mama EO771 foi obtido de uma linha celular estabelecida a partir de tumores espontâneos em camundongos BALB/c, caracterizado por sua agressividade e capacidade de formar tumores sólidos em mamíferos (JIA, YU *et al.* 2014). Um criotubo contendo 1 mL de células de tumor de mama EO771, mantido congelado em nitrogênio, foi rapidamente descongelado com auxílio de banho-maria (37 °C). As células foram transferidas para um frasco de cultura em capela de fluxo laminar, com adição de meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma Aldrich, Suíça), suplementado com 10% de soro fetal bovino - FBS (Sigma Aldrich, Suíça) e 1% penicilina/estreptomicina (Gibco by Life Technologies). O frasco contendo as células foi mantido em incubadora a 37 °C e 5% de CO₂ e atmosfera úmida. O crescimento celular e a viabilidade foram monitorados a cada três dias, com transferência para outros frascos até atingir a quantidade necessária para inoculação.

Para a inoculação das células, elas foram cultivadas até a sua confluência e soltas do frasco de cultura celular por meio da ação de tripsina/EDTA 0,25% e deixada na estufa por 2 min. Após esse tempo, a mesma foi retirada da estufa e a ação da tripsina foi interrompida por meio da adição de meio para a suspensão das células. A seguir, as células foram transferidas para um tubo falcon e centrifugadas por 5 minutos

em uma velocidade de 12000 rpm. O sedimento celular foi lavado duas vezes com PBS, pré-aquecido e as células foram suspensas em meio DMEM. A contagem celular e a viabilidade foram avaliadas usando o teste de exclusão Trypan Blue em uma câmara Neubauer 9020-01 (HBG, Germany) utilizando um microscópio Telaval 31.

5.5 Modelo murino de tumor de mama E0771

Para a realização da inoculação das células os animais foram anestesiados com Isoflurano 3% em 95% oxigênio (O₂) e foram inoculadas por via subcutânea na primeira glândula cervical direita com $2,5 \times 10^5$ células em 100 μ L de meio DMEM utilizando uma seringa de insulina e agulha 13mm x 0,33mm.

Após o inóculo, os seguintes parâmetros foram observados diariamente: mortalidade, sinais clínicos, variações no peso corporal e no consumo de água e ração. Dos animais inoculados com células tumorais, todos apresentaram crescimento tumoral.

Figura 4 - Inoculação das células tumorais na primeira glândula cervical direita



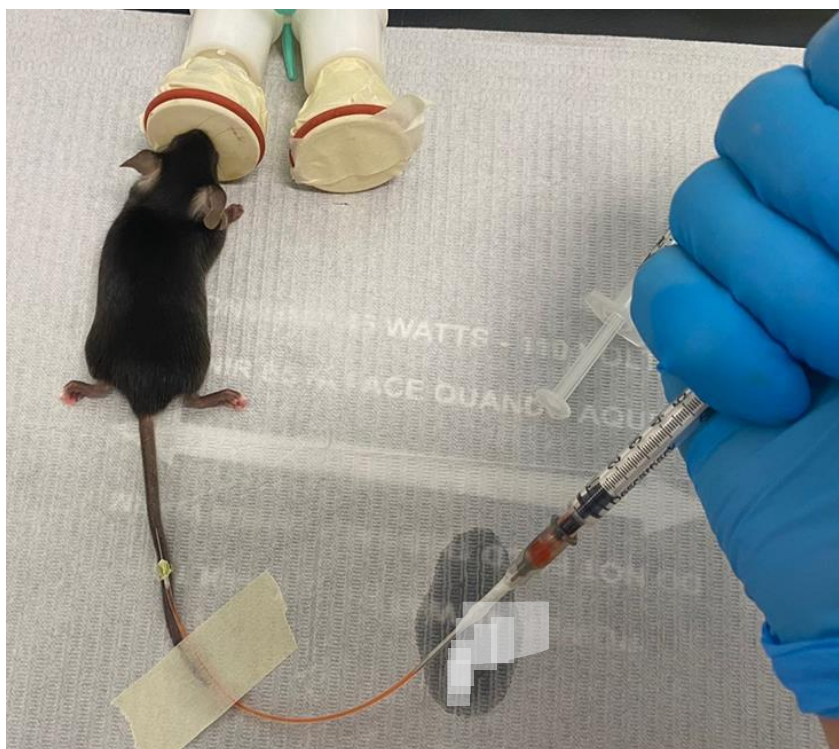
Fonte: Elaborado pela autora.

5.6 Tratamento com Doxo

O tratamento com a Doxo foi iniciado 7 dias após a inoculação das células tumorais nos animais independentemente do tamanho do tumor. Os grupos de animais tratados com Doxo receberam injeção intravenosa com 100 μ L de 5 mg/kg de cloridrato de doxorubicina por cinco semanas, totalizando 25 mg/kg. A doxorubicina utilizada possuía 98,6% de pureza sem adição de adjuvantes (Eurofarma, São Paulo, Brasil). A cada semana, o animal era pesado e realizado o cálculo da dose ideal para o seu peso. Os animais do grupo controle receberam 100 μ L de salina por injeção intravenosa.

No grupo de animais que foi submetido ao exercício, o TFA foi iniciado juntamente com o tratamento da Doxo. Os animais realizavam o TFA 4 vezes na semana (segunda a quinta-feira) e então, eram submetidos ao tratamento com Doxo, às sextas-feiras. Neste dia os animais não realizavam o TFA e descansavam por dois dias após o tratamento com Doxo (GOMES-SANTOS; JORDÃO; PASSOS; BRUM *et al.*, 2021).

Figura 5 - Tratamento com Doxo via intravenosa



Fonte: Elaborado pela autora

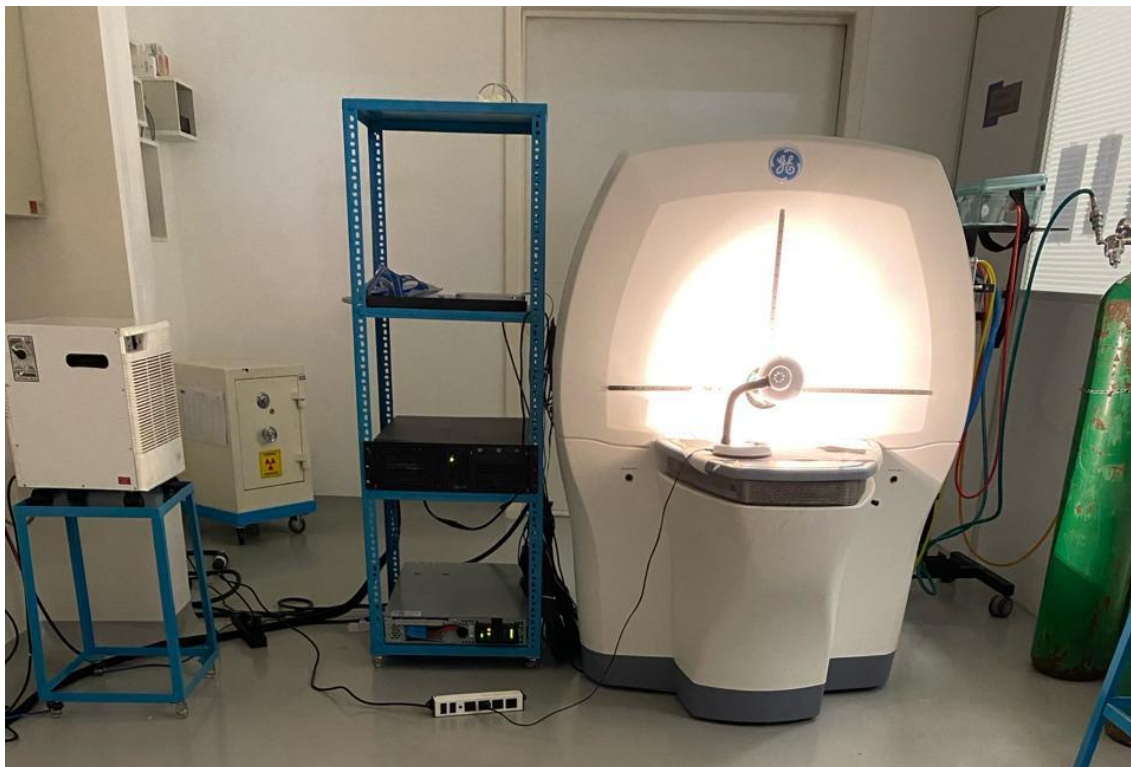
5.7 Imagens de Tomografia por Emissão de Pósitrons com ^{18}F -FDG

A aquisição das imagens positrônicas foi realizada na S2, S4 e S6 para acompanhamento da evolução da cardiotoxicidade ao longo do experimento. Para isso, foi utilizado um MicroPET dedicado para aquisição e reconstrução de imagens de tomografia positrônica para pequenos animais (General Electric Healthcare modelo LabPET 4 solos) na Unidade de Pesquisa de Radiofármacos do CDTN. Trata-se de um PET-scanner, totalmente digital, baseado em fotodiodos avalanche (APD). O Conjunto de detecção é constituído por pares de cristais LYSO/LGSO com dimensões de 2x2x12 mm. Cada par de cristais acoplado a um APD constitui um canal e, ao todo são 1536 canais. O campo de visão (FOV) transversal mede 11,0 cm e os axiais 3,75 cm. A sensibilidade considerando uma janela de energia de 250-650 KeV é de aproximadamente 1,1%.

Os animais foram posicionados em prono e o coração e o tumor localizados o mais próximo possível do centro do FOV. Os sinais vitais foram monitorizados e a anestesia era ajustada para manutenção da frequência respiratória entre 15 e 25 incursões por minutos (monitorada através de um travesseiro pneumático pequeno). A frequência cardíaca foi monitorada através do eletrocardiograma (ECG). A temperatura corporal foi mantida em 37°C através de sistema de aquecimento por luz durante toda a aquisição da imagem, com o principal objetivo de evitar hipotermia e o aparecimento de tecido adiposo marrom nas imagens.

Para a avaliação do metabolismo, função e morfologia miocárdica, os animais foram mantidos anestesiados com isoflurano com dose de indução 3% em 95% O₂ e uma dose de manutenção de 1,5% em 0,8 L/min de O₂ por vinte minutos para aumento da captação do ¹⁸F-FDG pelos miócitos cardíacos (THACKERAY; PIETZSCH; STAPEL; RICKE-HOCH *et al.*, 2017). Neste período o animal foi mantido sobre uma manta elétrica aquecida, com o objetivo de evitar hipotermia e dilatar a cauda. Após esse período, uma dose de 20 MBq de ¹⁸F-FDG foi injetada na veia caudal lateral através de uma cânula de polietileno (MAXION B10) com 20 cm confeccionada pelo pesquisador. Uma imagem sincronizada com o ECG foi adquirida por 20 minutos após 40 minutos da injeção de ¹⁸F-FDG. Para isso, o animal foi posicionado com as patas dianteiras nos eletrodos dianteiros e a pata traseira esquerda no eletrodo traseiro utilizando um gel condutor (MERCUR).

Figura 6 - Sistema MicroPET dedicado para aquisição e reconstrução de imagens de tomografia positrônica para pequenos animais (General Electric Healthcare modelo LabPET 4 solos).



Fonte: Elaborada pela autora

Foram realizadas duas reconstruções dessa imagem: 1) reconstrução estática dos 20 minutos de captação para avaliar o metabolismo miocárdico de glicose; 2) reconstrução sincronizada com o eletrocardiograma (8 fases por ciclo cardíaco completo) para avaliação da fração de ejeção e mensuração dos volumes sistólico e diastólico do ventrículo esquerdo. As imagens adquiridas foram reconstruídas em matriz de 184 X 184 x 64 utilizando o algoritmo MLEL – 3D (20 iterações) com alta resolução e sem correção por atenuação ou espalhamento.

A glicemia foi avaliada com o auxílio de glicosímetro (Accu-Chek, Roche, Indiana, Estados Unidos). Para isso, uma gota de sangue foi depositada na tira-teste. A tira-teste foi inserida no monitor que lê e quantifica a glicemia. A gota de sangue (máximo 5ul) foi coletada cuidadosamente da veia caudal lateral dos camundongos antes da injeção de ^{18}F -FDG e ao final da aquisição da imagem.

Após o fim da imagem o animal foi retirado cuidadosamente do leito do PET e colocado em uma gaiola limpa com papel para evitar aspiração de pó de maravalha e mantido isolado até sua total recuperação.

5.8 Análise das Imagens

A análise da captação miocárdica de ^{18}F -FDG nas imagens estáticas foram realizadas através do software AMIDE. As regiões de Isocontorno 3D de interesse (ROIs) foram selecionadas ao longo de todo o ventrículo esquerdo e o valor de absorção padronizada (SUV, g/cm^3) foi avaliado.

Para análise semiquantitativa, o SUV foi calculado usando o valor médio do volume de interesse (VOI) através da fórmula: $\text{SUV} = [\text{concentração média de atividade tecidual (MBq/mL)} / \text{dose injetada (MBq)} / \text{peso corporal (g)}]$ para cada região. Foi assumida uma densidade de tecido de 1 g/mL .

As imagens gateadas foram utilizadas para avaliar os volumes e a fração de ejeção do ventrículo esquerdo (VE) através do software Segment (Medviso, Suécia). Após identificação dos frames sistólicos e diastólicos finais, um VOI dinâmico foi desenhado ao longo da borda endocárdica no eixo curto do VE por toda sua extensão para determinação dos volumes diastólico (Vd) e sistólico (Vs) finais. A fração de ejeção do ventrículo esquerdo foi determinada pela fórmula: $(\text{Vd} - \text{Vs}) / \text{Vd} \times 100$. O software fornece ainda a medida de volume sistólico (VS) e débito cardíaco (DC).

5.9 Avaliação da Capacidade Aeróbica

Previamente ao teste de TCP, os animais foram climatizados à esteira rolante para pequenos animais (Gaustec®, Nova Lima, MG, Brasil) por 5 dias consecutivos com velocidades incrementais e inclinação fixa 0° (TEIXEIRA-COELHO; FONSECA; BARBOSA; VAZ *et al.*, 2017). Para a ambientação à esteira, os animais foram mantidos dentro do equipamento por cinco minutos com ela desligada e em seguida correram por mais 5 minutos a uma velocidade de 5 a 6 m/min (LACERDA; MORAES; NUNES-SILVA; COSTA *et al.*, 2019). O método de avaliação da capacidade aeróbica foi selecionado devido à sua capacidade de fornecer uma medida objetiva e

quantitativa do desempenho físico dos animais em resposta ao protocolo de treinamento.

Tabela 1- Protocolo de familiarização planejado para ensinar os camundongos correr na esteira rolante.

Dia	Estágio 1	Estágio 2
1	5 min de repouso	5 min à 5 m/min
2	5 min de repouso	5 min à 6 m/min
3 e 4	5 min de repouso	5 min à 6 m/min
5	Familiarização ao teste de carga incremental	

Fonte: Adaptado de (LACERDA; MORAES; NUNES-SILVA; COSTA *et al.*, 2019).

Para avaliação da aptidão cardiorrespiratória dos animais, o consumo de oxigênio (VO_2) foi mensurado continuamente por calorimetria indireta de fluxo aberto em esteira com velocidade e inclinação incremental (Panlab/Harvard Apparatus). O VO_2 foi expresso em unidades ajustadas ao tamanho do animal ($mL.kg^{-0,75}.min^{-1}$) e o VO_2 pico foi definido como o maior valor de VO_2 mensurado durante o teste de exaustão.

O protocolo de estresse foi descrito e validado por PETROSINO; HEISS; MAURYA; KALYANASUNDARAM *et al.*, 2016. O protocolo consiste em aumentar a velocidade e a inclinação da esteira a cada etapa. As 3 primeiras etapas duraram 2 minutos com aumento de 5 graus na inclinação em cada etapa. A partir da etapa 4 a duração passou a ser de 1 minuto e a inclinação foi mantida em 15 graus. A velocidade foi iniciada em 15 cm/s e aumentou 5 cm/s a cada etapa até a etapa 6. A partir daí a velocidade aumentou 1,67 cm/s a cada etapa até a exaustão do animal (Tabela 2). Os critérios para interrupção do teste foram: os animais permanecerem por tempo igual ou superior a 5 segundos na grade de estimulação elétrica; ou permanecerem por 10 segundos na extremidade distal da esteira (PETROSINO; HEISS; MAURYA; KALYANASUNDARAM *et al.*, 2016; TEIXEIRA-COELHO; FONSECA; BARBOSA; VAZ *et al.*, 2017).

Os TCP foram realizados no mesmo horário do dia no Laboratório de Fisiologia do Exercício (LAFISE) da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional (EEFFTO) da UFMG por examinador cego a qual grupo os animais pertenciam para minimizar o risco de viés.

Tabela 2 - Protocolo do teste de VO₂ em camundongos.

Estágio	Velocidade	Velocidade	Inclinação	Duração
	<i>(m/min)</i>	<i>(cm/s)</i>	<i>(% grade)</i>	<i>(min)</i>
1	9	15	3	2
2	12	20	6	2
3	15	25	10	2
4	18	30	10	1
5	21	35	10	1
6	23	38	10	1
7	24	40	10	1
8	25	42	10	1
9	26	43	10	1
10	27	45	10	1
11	28	47	10	1
12	29	48	10	1
13	30	50	10	1
14	31	52	10	1
15	32	53	10	1
16	33	55	10	1
17	34	57	10	1
18	35	58	10	1
19	36	60	10	1
20	37	62	10	1

5.9.1 Treinamento Físico Aeróbico (TFA)

O TCP foi realizado no início e final do tratamento dos animais. Após determinar a velocidade de treinamento através do TCP, os animais foram submetidos ao TFA em

intensidade baixa a moderada. Na primeira semana, a esteira foi configurada em uma velocidade de 40% da capacidade máxima atingida no TCP por 20 minutos e no dia seguinte, o tempo foi aumentado para 30 minutos. Na segunda semana, a esteira permaneceu na velocidade de 40% e o tempo progrediu para 35 minutos e por fim, o tempo de treinamento foi fixado em 40 minutos até o final do protocolo. Na terceira, quarta e quinta semana, a esteira foi configurada em uma velocidade de 50% da capacidade máxima atingida no teste incremental por 40 minutos. Durante todo o treinamento a esteira foi mantida com inclinação de 0%. O protocolo de treinamento detalhado pode ser observado na Tabela 3.

Os animais realizaram o TFA quatro vezes por semana por cinco semanas. As sessões de exercícios foram realizadas de segunda a quinta-feira sempre no período da manhã para manter o ritmo circadiano dos animais. Às sextas feiras eram dedicadas ao tratamento com Doxo (GOMES-SANTOS; JORDÃO; PASSOS; BRUM *et al.*, 2021). As intensidades de treinamento foram selecionadas com base na capacidade aeróbica inicial dos animais, com o objetivo de proporcionar um estímulo adequado para promover adaptações fisiológicas ao longo do protocolo de treinamento.

Tabela 3 - Protocolo de TFA dos camundongos

	Sessão 1	Sessão 2	Sessão 3	Sessão 4
S1, inclinação 0°				
Intensidade (% da velocidade máxima)			40	40
Duração (min)			20	30
S2, inclinação 0°				
Intensidade (% da velocidade máxima)	40	40	40	40
Duração (min)	35	40	40	40

S3-5, inclinação 0°				
Intensidade (% da velocidade máxima)	50	50	50	50
Duração (min)	40	40	40	40

5.10 Avaliação da Força

O protocolo de mensuração da força muscular foi executado conforme previamente descrito. O método de avaliação da força muscular foi previamente validado e demonstrou alta confiabilidade na medição da força de preensão em pequenos roedores, garantindo a precisão e consistência dos resultados. (BONETTO; ANDERSSON; WANING, 2015). Para isso, foi utilizado um medidor de força de preensão (Grip Strength Meter, BONTHER, Ribeirão Preto, SP, Brasil) próprio para pequenos roedores, que contém um suporte com grade cuja angulação foi ajustada em 45 graus. O animal foi aproximado do suporte de forma que ele se segure na grade somente com as patas dianteiras ou com as quatro patas, e então sua cauda foi segurada pelo terço proximal e puxada horizontalmente até que o animal se solte da grade. Ressalta-se que foi realizado um protocolo de confiabilidade da medida executada pelo pesquisador através de um protocolo de familiarização dos animais ao equipamento. Os testes foram realizados 48 horas após o TCP e foram realizadas 6 medidas com 1 minuto de intervalo entre elas. A força foi determinada através da média dos valores registrados.

5.11 Eutanásia e Coleta de Tecidos

A eutanásia dos animais foi realizada em conformidade com as diretrizes da prática de eutanásia de animais de laboratório (CONCEA, 2016) (<RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 30, DE 02 DE FEVEREIRO DE 2016..pdf>). O momento da eutanásia foi determinado com base em critérios pré-estabelecidos, incluindo o estado clínico dos animais e a conclusão dos procedimentos experimentais planejados. Para isso, os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de ketamina (84

mg/kg) e xilazina (11,2 mg/kg) e sacrificados por exsanguinação. Foram coletados o tumor primário e o coração.

Após a eutanásia dos animais, o coração foi exposto e injetado 1 ml de KCL10% no coração do animal até a parada total. O coração foi retirado e realizado a limpeza delicadamente com a tesoura para retirar todos os resíduos de artérias. O coração foi secado utilizando um papel filtro e pesado o coração inteiro em uma balança analítica calibrada. Com o auxílio de um bisturi os átrios direito e esquerdo foram removidos. O ápice do coração foi retirado e incluído em formaldeído tamponado 10% e 24 horas após a inclusão, a solução foi trocado por álcool 70% e mantido em temperatura ambiente. O restante do coração foi imergido por 24 horas em volume de 10 ml de PFA 4% gelado em um tubo falcon de 15 ml. Nas primeiras 2 horas, o falcon contendo o coração foi mantido imergido no gelo e após esse tempo, retirado e deixado em temperatura ambiente. No dia seguinte, o coração foi retirado do tubo falcon e colocado em outro tubo falcon com solução de PBS por 10 minutos. Em seguida, o coração foi imerso em solução de sacarose 30% em tudo falcon e deixado por 24 horas na geladeira. Após as 24 horas, o coração que estava decantado, foi retirado do tubo falcon e lavado por três vezes com solução de PBS e incluído em OCT.

Após a retirada do coração, o tumor foi removido inteiro e incluído em formaldeído tamponado 10%. Após 24 horas, a solução de formaldeído foi descartada e preenchido de álcool 70% e mantido em temperatura ambiente.

5.11.1 Avaliação in situ da expressão do CD68 no coração

As seções transversas do VE do coração foram incubadas com solução de PFA 4% por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas 3 vezes com BSA1% e realizado o bloqueio de proteínas inespecíficas com BSA 3 % em temperatura ambiente por 30 minutos. As lâminas foram lavadas novamente com BSA1% e incubadas *overnight* em uma câmara úmida com o seguinte anticorpo primário diluído em BSA 3%: CD68 monoclonal Antibody (FA-11) (1:200, eBioscience). A avaliação da expressão do CD68 no coração é de particular importância devido ao seu papel como marcador de inflamação e resposta imune, fornecendo insights importantes sobre os processos patofisiológicos em estudo. As lâminas controle negativo, receberam o mesmo volume de BSA (3%). No dia seguinte,

as lâminas foram lavadas três vezes com solução BSA 1% e em seguida o anticorpo secundário (Alexa Fluor 555 Invitrogen 1:300) foi diluído em solução BSA a 1%. As lâminas foram incubadas em temperatura ambiente por 1 hora. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes com solução BSA 1%. As lâminas foram montadas em seguida e seladas com fluoromount (meio de montagem). As imagens foram capturadas com um microscópio de fluorescência Zeiss-APOTOME, usando filtro 461 nm para o DAPI e 555 nm para a Rhodamina. O software ZEN (versão 3.3.89.0000) foi utilizado para analisar a intensidade de fluorescência, que foi normalizada para a área selecionada. As análises foram realizadas por dois avaliadores independentes cegados e foi realizada a média dos resultados entre eles.

5.11.2 Avaliação *in situ* da produção de espécies reativas de oxigênio no coração

A avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio no coração é essencial para entender o papel do estresse oxidativo na fisiopatologia da doença em estudo e identificar potenciais alvos terapêuticos. Portanto, para isso, as seções transversais do coração foram incubadas por 30 minutos a 37°C, com 200 µl/lâmina de dihidroetídio (DHE - 10 µM) (life technologies) para avaliar a produção de ROS. As lâminas foram então fixadas por 5 minutos com paraformaldeído (PFA) a 4% e seladas com fluoromount. As lâminas controle negativo, receberam o mesmo volume de PFA 4%. As imagens foram capturadas com um microscópio de fluorescência Zeiss-APOTOME, usando filtro 555 nm para o DHE. O software Fiji (versão 1.51j8) foi utilizado para analisar a intensidade de fluorescência, que foi normalizada para a área selecionada. As análises foram realizadas por dois avaliadores independentes cegados e foi realizada a média dos resultados.

5.12 Análise Estatística

Todos os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil. A distribuição das variáveis foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

Para testar a diferença entre médias de dois grupos foi empregado o Teste t de Student, para variáveis com distribuição normal, e o Teste de Mann-Whitney, para as

variáveis com distribuição não-normal. A análise de variância ANOVA unidirecional foi utilizada para comparação simultânea dos quatro grupos experimentais para análises histopatológicas.

Para as análises de correlação, foi utilizado o teste de Pearson quando as variáveis apresentavam uma distribuição normal, e o teste de Spearman quando as variáveis não seguiam uma curva de distribuição normal.

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) para modelos mistos de medidas repetidas em um dos fatores (*mixed ANOVA* ou *split-plot factorial ANOVA*). Dessa forma, foi verificado o efeito resultante da interação (*main effect*) de duas variáveis independentes: tempo e grupo. O fator tempo associa-se a efeitos e potenciais diferenças em um mesmo indivíduo (*within-subjects effects*), enquanto o grupo, associa-se a efeitos e potenciais diferenças entre os indivíduos (*between-subjects effects*). O objetivo dessa análise foi avaliar se há interação significativa entre esses fatores sobre as variáveis dependentes. Apenas animais que sobreviverem até o final do estudo foram incluídos nessa análise.

As análises foram realizadas com o auxílio do programa GraphPad Prism, versão 9.5.0 (Graphpad Software, La Jolla, CA, USA), e os testes estatísticos específicos foram selecionados com base na distribuição das variáveis e nos objetivos do estudo. O nível de significância estabelecido foi de 5% bicaudal ($p < 0,05$).

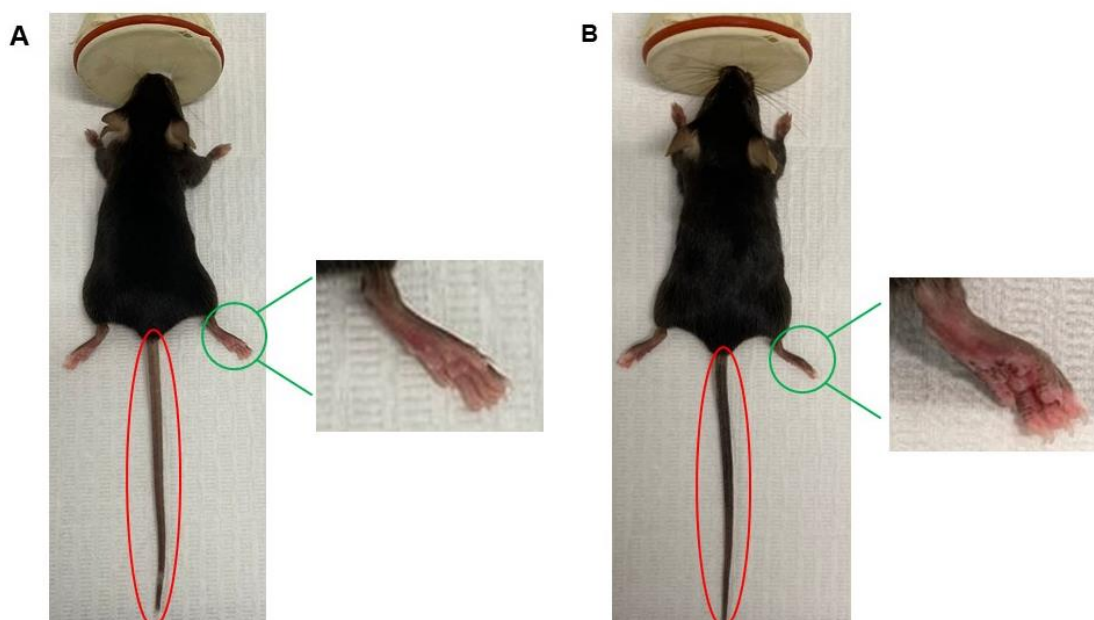
6. RESULTADOS

6.1 Padronização do modelo de cardiotoxicidade

6.1.1 Avaliação clínica e de mortalidade

Ao longo do estudo, observou-se que alguns dos animais do grupo Doxo e Tm+Doxo apresentaram hiperpigmentação das unhas, plantas dos pés e na cauda, conforme demonstrado na Figura 7.

Figura 7- Hiperpigmentação nos animais que receberam tratamento com Doxo.



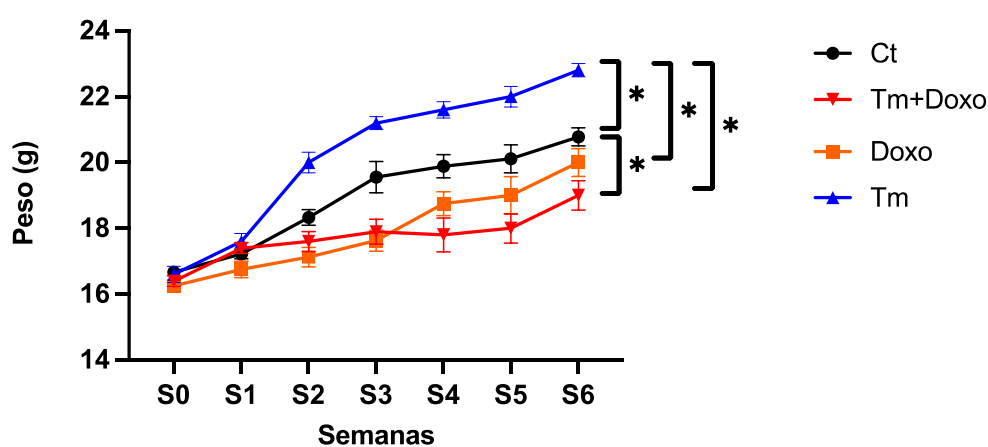
(A) Animal Ct – ausência de hiperpigmentação na cauda e plantas dos pés. (B) Animal Doxo – presença de hiperpigmentação na cauda e plantas dos pés. Abreviações: Ct= Controle; Doxo= Doxorubicina.

Ao longo das semanas do experimento, todos os grupos apresentaram ganho de peso em relação ao peso basal (Figura 8). Comparado ao peso inicial, o grupo Ct apresentou aumento de peso significativo desde a S2 ($p=0,002$) até a S6 ($p<0,001$). O grupo Tm apresentou um comportamento semelhante ao grupo Ct, embora mais intenso, com aumento de peso na S1 ($p<0,001$) até a S6 ($p<0,001$). O grupo Doxo apresentou ganho de peso somente na S3 ($p=0,047$) até a S6 ($p=0,002$). No grupo

Tm+Doxo apresentou um aumento do peso corporal na S1 ($p<0,001$), S2 ($p=0,006$), S3 ($p=0,028$) e S6 ($p=0,003$).

Na última semana de experimento, o grupo Tm apresentava maior peso em comparação a todos demais grupos ($p<0,05$). O grupo Tm+Doxo apresentou o menor peso ao final do experimento com diferença significativa também em comparação ao grupo Ct ($p=0,02$). Não foi observada diferença significativa entre os grupos Doxo e Tm+Doxo.

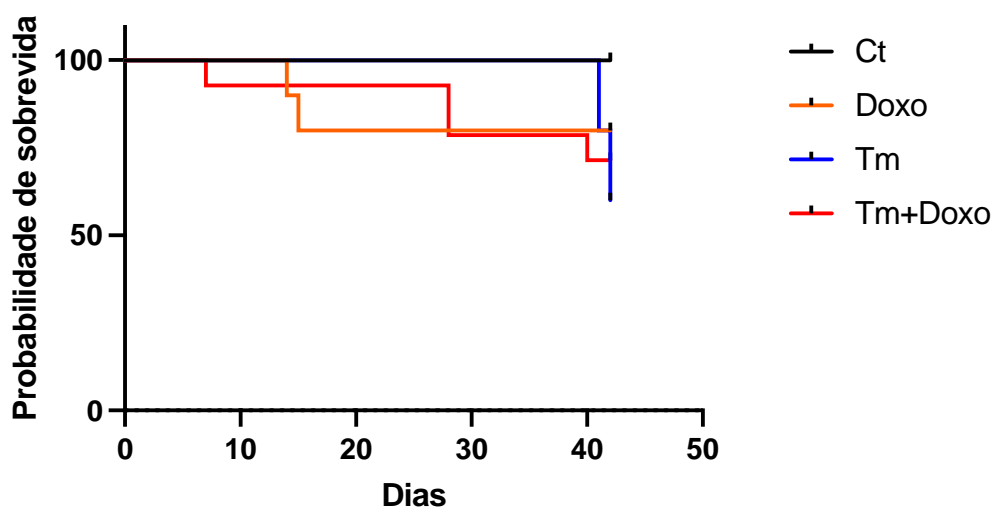
Figura 8 - Peso corporal dos animais durante o experimento



Representação gráfica do peso corporal dos animais durante as semanas de experimento. Abreviações: Ct= Controle; Doxo= Doxorubicina; g= gramas; Tm= Tumor; S= Semana. Os dados são expressos como média \pm S.E.M. * = $p<0,05$ vs respectivo grupo na S6.

Foi observada uma mortalidade de dois animais do grupo Doxo (20%) na terceira semana de tratamento e quatro animais do grupo Tm+Doxo (28,6%), sendo um animal na primeira semana e três animais na quarta semana. Dois animais do grupo tumor morreram no último dia de experimento. Não observado diferença significativa entre os grupos na análise de sobrevivência pela curva de Kaplan Meier (Figura 9).

Figura 9 - Probabilidade de sobrevivência



Representação gráfica da probabilidade de sobrevivência durante as semanas de experimento. Abreviações: Ct= Controle; Doxo= Doxorrubicina; Tm= Tumor. Os dados são expressos como média \pm S.E.M

6.1.2 Função sistólica e morfologia ventricular esquerda pelas imagens pet sincronizadas com o ECG

Os dados evolutivos da função sistólica e da morfologia do ventrículo esquerdo nos animais dos diferentes grupos que sobreviveram até o final do estudo são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Sumário dos resultados da avaliação da função sistólica e morfologia ventricular esquerda dos animais nos grupos Ct, Doxo, Tm e Tm+Doxo.

Variáveis	Ct (n=9)	Doxo (n=9)	Tm (n=5)	Tm+Doxo (n=10)	Valor P
FEVE (%)					
S2	69,26 \pm 0,9	67,09 \pm 2,7	65,95 \pm 1,42	67,6 \pm 1,34	
S4	69,5 \pm 1,21	62,89 \pm 2,1 [†]	61,65 \pm 1,28 [†]	64,33 \pm 1,3 [*]	
S6	68,55 \pm 0,8	58,03 \pm 1,45 ^{*†}	61,67 \pm 2,15	61,41 \pm 1,51 ^{*†}	0,107
VDFVE (μ l)					
S2	28,71 \pm 1,92	25,66 \pm 1,52	26,16 \pm 2,07	25,59 \pm 1,41	
S4	27,43 \pm 1,32	26,32 \pm 1,10	30,40 \pm 1,75 [*]	28,22 \pm 1,1	

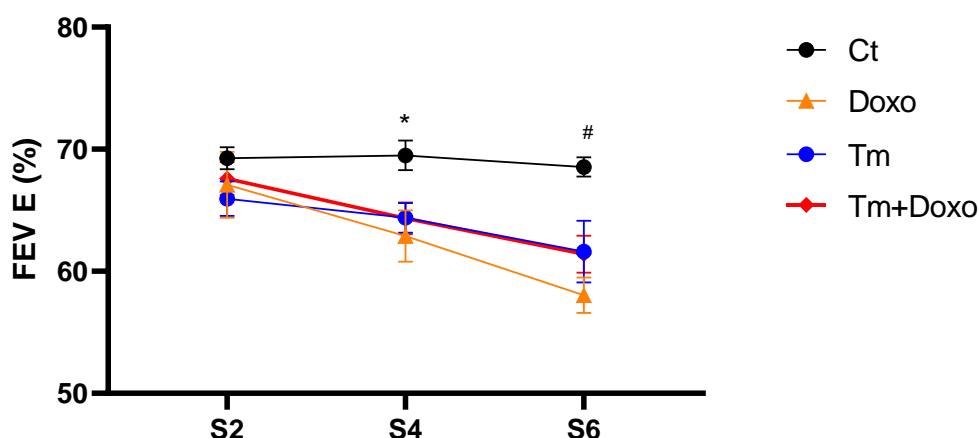
S6	31,11±1,46	27,48±1,68	31,20±2,5	27,12±1,05	0,162
VSFVE (µl)					
S2	8,8±0,64	8,3±0,73	9,0±1,05	8,3±0,64	
S4	8,4±0,66	9,8±0,65	10,84±0,76	10,2±0,72*	
S6	10,10±0,68	11,5±0,70*	12,14±1,5	10,43±0,51*	0,277
Volume sistólico (µl)					
S2	19,89±1,36	17,30±1,40	17,14±1,02	17,3±0,95	
S4	19±0,75	16,6±0,92	19,67±1,14	18,05±0,49	
S6	21±0,88	16±1,15†	19,06±1,26	16,68±0,83†	0,117
Frequência cardíaca (bpm)					
S2	244±12,9	264±15,12	245±9,9	264±8,9	
S4	283±10,8*	223±7,64	291±13,9*	311±6*	
S6	303±20	302±15,88	323±24,8	270±10	0,039
Débito cardíaco (ml)					
S2	4,75±5,7	4,6±0,42	4,2±0,25	4,6±0,29	
S4	5,4±0,2	4,7±0,25	5,92±0,43*	5,5±0,19*	
S6	6,4±0,6*	4,9±0,56	6,44±0,88	4,4±0,26†	0,031

Os dados são apresentados como média±SEM. Abreviações: Controle (Ct), Doxorubicina (Doxo), Tumor (Tm). FEVE= fração do ventrículo esquerdo; VDFVE= volume diastólico final do ventrículo esquerdo; VSFVE=volume sistólico final do ventrículo esquerdo. Valor de P se refere ao efeito principal no teste de ANOVA mista. *p≤0.05 vs. semana 1 do mesmo grupo, † p≤0.05 vs Ct, Teste de comparação múltipla de Šidák.

Como pode ser observado na Tabela 4 e Figura 10, houve queda progressiva da FEVE nos grupos Doxo e Tm+Doxo. Foi observada diferença significativa nos fatores “Tempo (p<0,001)” e “Grupos (p= 0,005)”. Entretanto, não foi observada diferença no fator “Tempo x Grupo (p= 0,107)”. No grupo Doxo, foi observada uma redução significativa da FEVE quando comparado a S2 e S6 (p= 0,037). O grupo Tm+Doxo apresentou uma redução significativa da FEVE na comparação entre S2 e S4 (p= 0,024) e S2 e S6 (p=0,003). Embora tenha sido observada redução da FEVE no grupo Tm, essa não atingiu significância estatística. Por fim, o grupo Ct não apresentou queda significativa da FEVE em nenhuma semana.

Na comparação dos valores de FEVE dos demais grupos em relação ao grupo Ct, foi observada diferença estatisticamente significativa no grupo Tm somente S4 ($p=0,034$). O grupo Doxo apresentou redução significativa da FEVE na S4 ($p=0,049$) e S6 ($p=0,002$), enquanto o grupo Tm+Doxo apresentou uma redução significativa na S4 ($p=0,027$), S6 ($p=0,003$) em comparação ao grupo Ct.

Figura 10 - Avaliação da FEVE.



Representação gráfica da redução da FEVE dos Grupos Ct, Doxo, Tm e Tm+ Doxo. Abreviações: Ct = Controle; Doxo = Doxorrubicina; Tm = Tumor; Tm+ Doxo = Tumor + Doxorrubicina; S= Semana; FEVE= Fração de ejeção do ventrículo esquerdo. Os dados são expressos como média \pm S.E.M. * = $p<0,05$ vs Grupo Tm, Grupo Doxo e Grupo Tm+Doxo; # = $p<0,05$ vs Grupo Doxo e Grupo Tm+Doxo.

Como observado na Tabela 4, não foram observadas diferenças significativas do VDFVE nos grupos Tm+Doxo, Doxo e Ct ao longo do experimento. Somente o grupo Tm apresentou aumento significativo do VDFVE da S2 vs S4 ($p= 0,0289$), mas que não foi observado na S6. Na comparação dos grupos em relação ao grupo Ct, não foram observadas diferenças estatísticas.

Os valores de VSFVE nos grupos Ct e Tm não apresentaram diferença estatística ao longo do experimento. Por outro lado, foi observado incremento significativo do VSFVE no grupo Doxo na S6 em relação a S2 ($p=0,032$). No grupo Tm+Doxo, em relação a S2, foi observado aumento significativo do VSFVE na S4 ($p= 0,010$) e S6 ($p=0,003$). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos em nenhuma janela temporal.

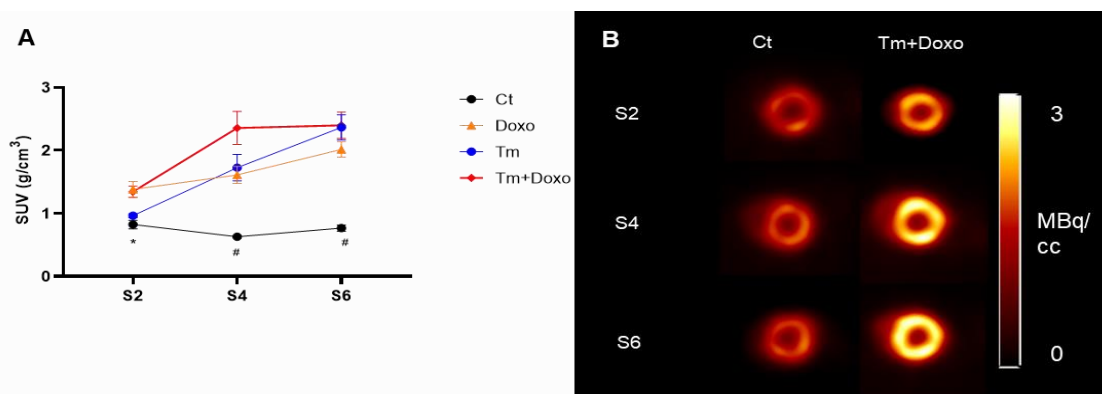
Além disso, o VS não apresentou diferença estatística em nenhum grupo quando comparada à avaliação de S2. Em comparação ao grupo Ct, foi observada diferença estatística somente na S6 nos grupos Doxo ($p=0,011$) e Tm+Doxo ($p=0,007$).

Em relação ao DC, o grupo Doxo não apresentou diferença significativa ao longo das semanas. O grupo Ct apresentou aumento significativo na S6 em relação S2 ($p=0,033$), enquanto que o grupo Tm apresentou incremento significativo do DC na S4 vs S2 ($p=0,005$), que não foi observado na S6. Foi observado incremento significativo do DC grupo Tm+ Doxo na S4 vs S2 ($p=0,01$). Entretanto, foi observada queda significativa do DC na S6 em relação a S4 ($p= 0,014$). Em comparação ao grupo Ct, apenas o grupo Tm+Doxo apresentou redução significativa do DC na S6($p=0,027$). Como observado na Tabela 1, essa queda do DC do grupo Tm+Doxo na S6 teve contribuição expressiva da queda da frequência cardíaca deste mesmo grupo.

6.1.3 Análise do metabolismo miocárdico do ventrículo esquerdo

A partir das imagens ^{18}F -FDG estáticas, foi avaliado o metabolismo miocárdico do ventrículo esquerdo (Figura 11). Desde a S2, os animais que foram submetidos à Doxorubicina (Grupo Doxo e Grupo Tm+Doxo) apresentaram maior SUV em relação ao grupo controle ($p<0,05$). Foi observado aumento da captação miocárdica de ^{18}F -FDG na S6 em relação a S2 em todos os grupos ($p< 0,05$), exceto no grupo controle ($p> 0,05$). Na S4 e S6, todos os grupos apresentaram significativamente maior captação de ^{18}F -FDG em relação ao Grupo Ct ($p<0,05$).

Figura 11 - Captação do SUV no ventrículo Esquerdo.



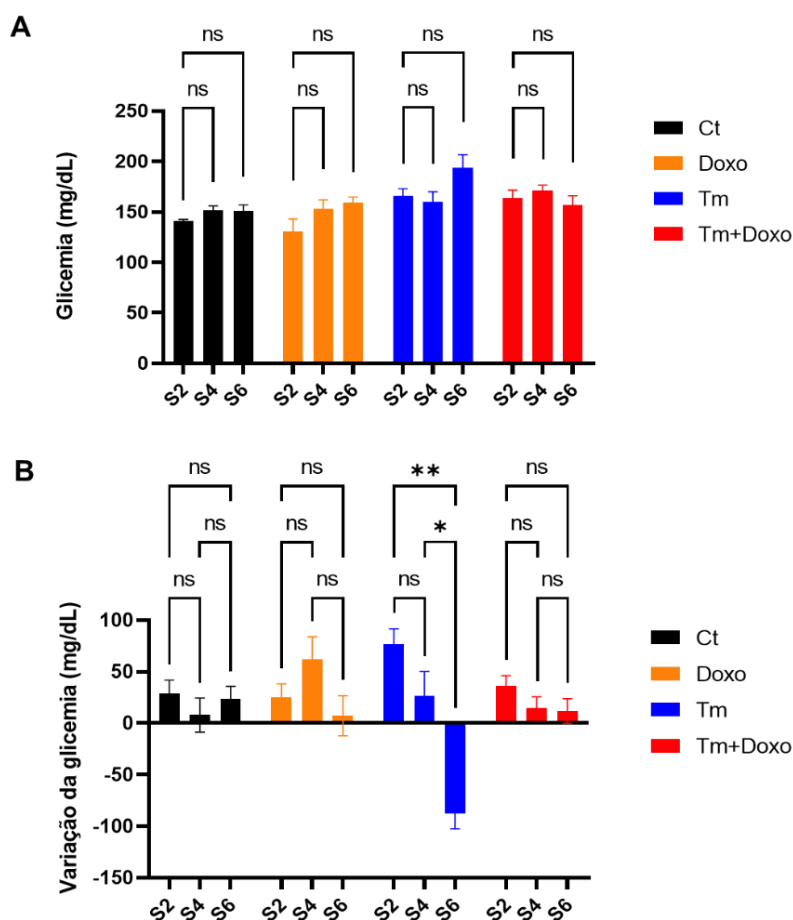
Representação gráfica da captação de SUV no ventrículo esquerdo. Abreviações: Ct = Controle; Doxo = Doxorrubicina; Tm = Tumor; Tm+ Doxo = Tumor + Doxorrubicina; S= Semana; SUV = valor padronizado de captação. Os dados são expressos como média \pm S.E.M. * = $p < 0,05$ vs Grupo Doxo e Grupo Tm+Doxo; # = $p < 0,05$ vs Grupo Doxo, Grupo Tm+Doxo e Grupo Tm.

6.1.4 Glicemia sanguínea

A glicemia sanguínea foi mensurada antes da administração do radiofármaco ^{18}F -FDG e ao final da aquisição da imagem para verificar sua variação. Não foi observada diferença significativa na glicemia pré administração do ^{18}F -FDG entre os grupos e ao longo das semanas, embora o grupo Tm apresentasse uma tendência a apresentar hiperglicemia na semana 6 (Figura 12 A).

Considerando a variação da glicemia ao longo da aquisição da imagem, foi observada diferença significativa no grupo Tm na S6 com relação S2 ($p=0,002$) e S4 ($p = 0,026$). Na comparação entre grupos, foi observada diferença significativa do grupo Tm em comparação a todos demais grupos somente na S6 ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa nos demais grupos (Figura 12 B).

Figura 12 - Mensuração da glicemia pré injeção de FDG



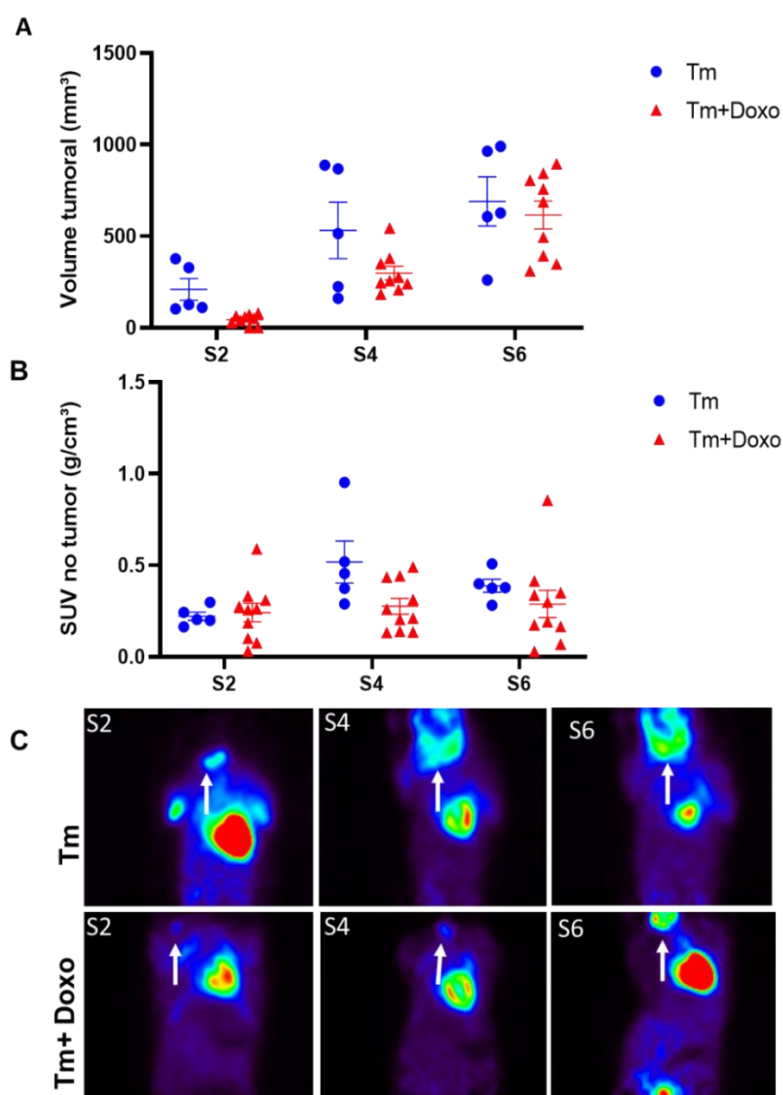
(A) e a variação da glicemia durante a aquisição da imagem (B). Abreviações: Ct = Controle; Doxo = Doxorubicina; Tm = Tumor; Tm+ Doxo = Tumor + Doxorubicina; S= Semana. Os dados são expressos como média \pm S.E.M. * = $p < 0,05$.

6.1.5 Avaliação do crescimento tumoral e captação de ^{18}F -FDG

O tamanho do tumor foi mensurado nas semanas (S2, S4 e S6) pelas imagens de ^{18}F -FDG. Na S2, a média do volume do tumor do grupo Tm foi de $209,1 \pm 59,2 \text{ mm}^3$, na S4 foi de $531,3 \pm 153,8 \text{ mm}^3$ e na S6 o tumor mediu $690,0 \pm 134,3 \text{ mm}^3$. No grupo m+Doxo, o volume tumoral foi de $43,79 \pm 9,7 \text{ mm}^3$, $298,4 \pm 37,2 \text{ mm}^3$ e $615,3 \pm 76,4 \text{ mm}^3$ na semana 2, 4 e 6, respectivamente. Embora os resultados não tenham apresentado diferença significativa no fator “Grupos x Tempo”, pode ser observado que o tratamento com Doxo retardou o crescimento tumoral, como observado na figura 13.

A atividade metabólica tumoral foi mensurada através da captação de ^{18}F -FDG no tumor na S2, S4 e S6. No grupo Tm a captação de ^{18}F -FDG na S2 foi de $0,22 \pm 0,023 \text{ g/cm}^3$, aumentou para $0,51 \pm 0,12 \text{ g/cm}^3$ na S4 e reduziu para $0,39 \pm 0,036 \text{ g/cm}^3$ na S6. No grupo Tm + Doxo, a captação foi de $0,24 \pm 0,051 \text{ g/cm}^3$ na S2, $0,28 \pm 0,043 \text{ g/cm}^3$ na S4 e $0,29 \pm 0,074 \text{ g/cm}^3$ na S6. Comparando os resultados no fator “Grupos x Tempo”, não houve diferença significativa entre eles. (figura 13).

Figura 13 - Avaliação do crescimento Tumoral e captação do SUV

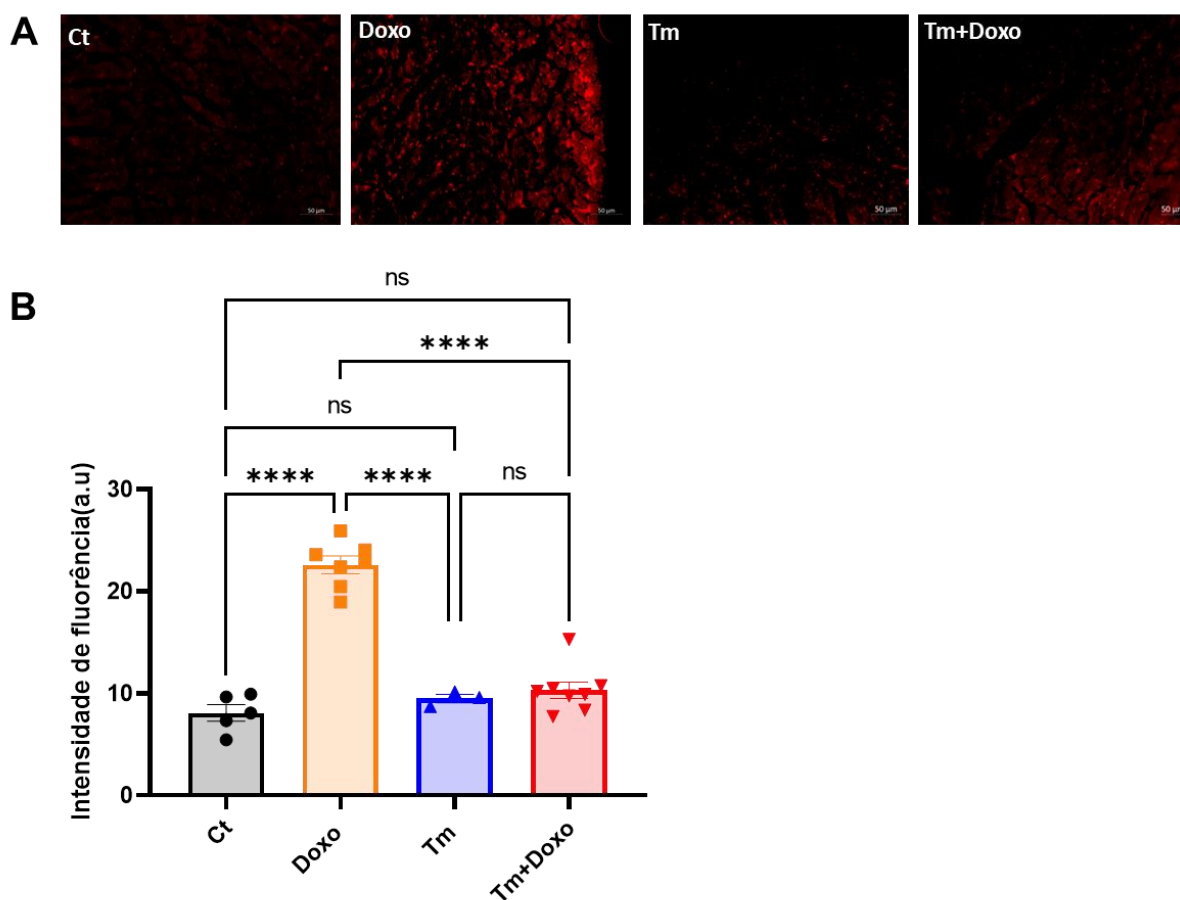


(A) Representação gráfica do crescimento tumoral ao longo das S2, S4 e S6 após inoculação das células, (B) Representação gráfica do SUV do tumor ao longo das S2, S4 e S6 após inoculação das células e (C) Figura representativa do crescimento tumoral com 14 dias, 28 dias e 42 dias após inoculação das células tumorais. Abreviações: Tm = Tumor; Tm+ Doxo = Tumor + Doxorubicina; S= Semana; SUV = valor padronizado de captação. Os dados são expressos como média \pm S.E.M. * = $p < 0,05$.

6.1.6 Avaliação da produção de ROS

Para avaliar a presença de ROS nos cardiomiócitos, a dosagem de ROS foi mensurada, utilizando a sonda DHE. A quantificação dos resultados mostrou que o grupo Doxo apresentou fluorescência aumentada quando comparado aos grupos Ct ($p < 0,001$), tumor ($p < 0,001$), e Tm+Doxo ($p < 0,001$) (Figura 14A e 14B).

Figura 14 - Avaliação da produção de ROS no coração

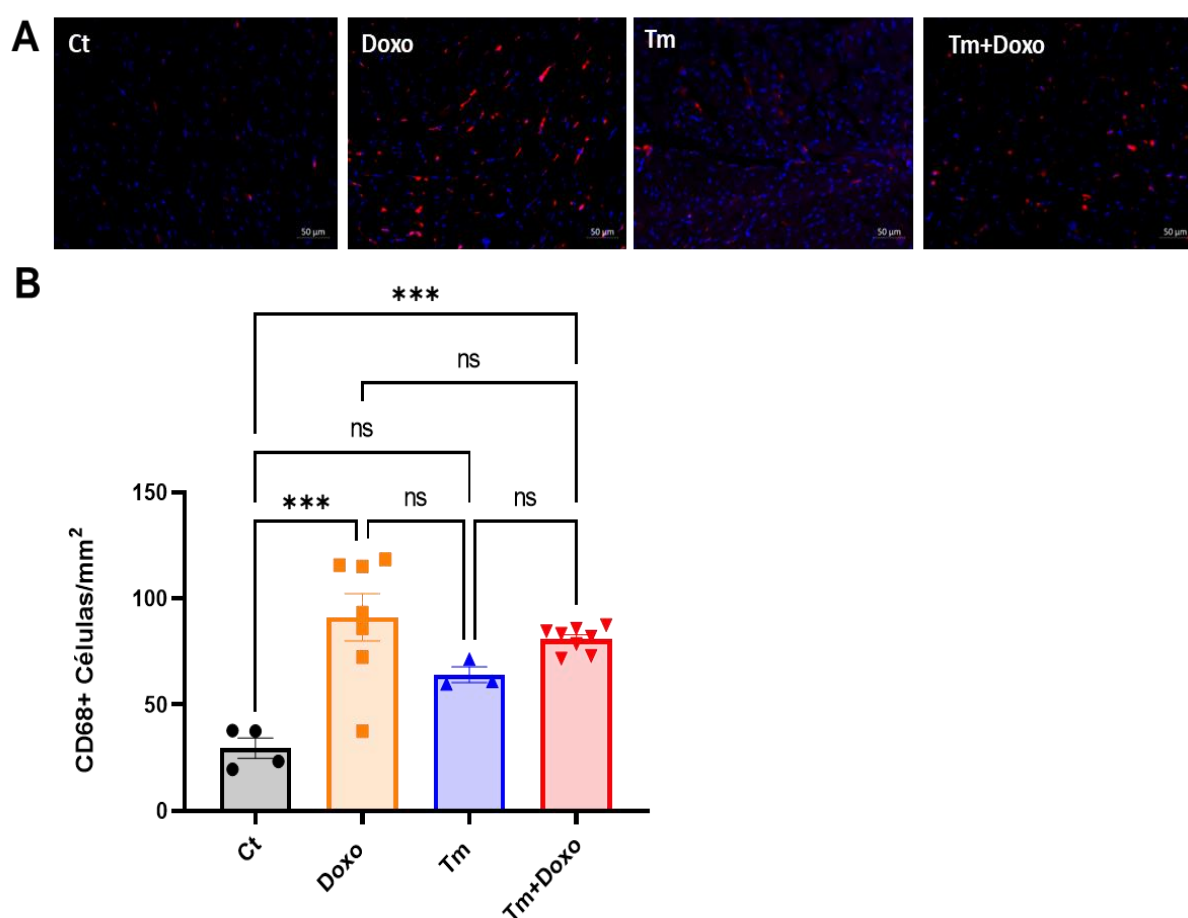


(A) Figura representativa da fluorescência da sonda DHE nos cardiomiócitos dos grupos Ct, Doxo, Tm e Tm+Doxo. (B) Representação gráfica da intensidade de fluorescência emitida pela sonda DHE, que reflete a quantidade de ROS presente no coração. Abreviações: Ct = Controle; Doxo = Doxorubicina; Tm = Tumor; Tm+Doxo = Tumor + Doxorubicina. Os dados são expressos como média \pm S.E.M. * $p < 0,05$.

6.1.7 Avaliação do processo inflamatório nos cardiomiócitos

A quantidade de macrófagos nos cardiomiócitos foi mensurada utilizando o marcador CD68. Foi observado que em relação ao grupo Ct, o grupo Doxo ($p= 0,002$) assim como o grupo Tm+Doxo ($p= 0,001$) apresentavam maior intensidade de inflamação (Figura 15 A e B). Não foi observada diferença significativa entre o grupo Tm e os demais grupos ($p> 0,05$).

Figura 15 - Avaliação do processo inflamatório nos cardiomiócitos

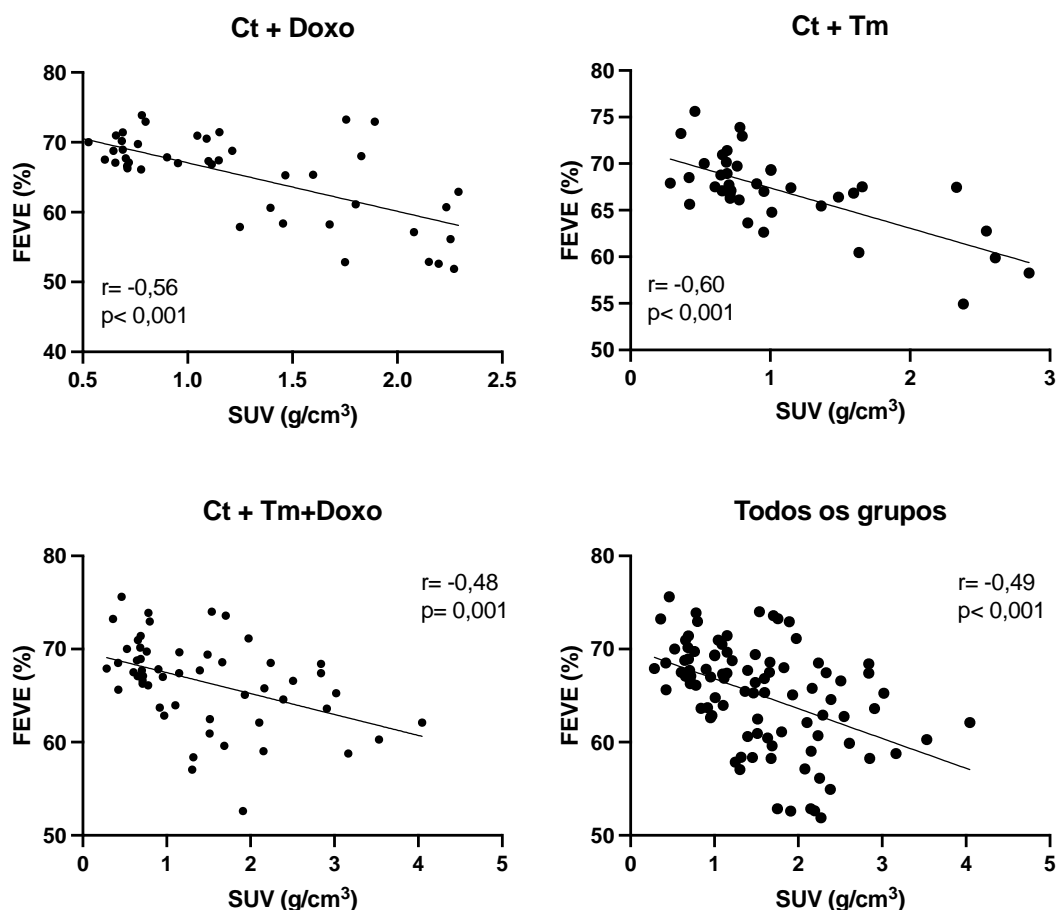


Avaliação do processo inflamatório nos cardiomiócitos. (A) Figura representativa infiltrado de macrófagos nos cardiomiócitos dos grupos Ct, Doxo, Tm e Tm+ Doxo. (B) Representação gráfica da quantidade de células, que reflete a quantidade de macrófagos presente no coração. Abreviações: Ct = Controle; Doxo = Doxorubicina; Tm = Tumor; Tm+ Doxo = Tumor + Doxorubicina. Os dados são expressos como média \pm S.E.M. * $p<0.05$.

6.1.8 Mecanismos associados ao aumento da captação de ^{18}F -FDG e à cardiotoxicidade

Na análise de correlação entre a captação miocárdica de ^{18}F -FDG e a FEVE em cada grupo associado ao grupo Ct, foi observada uma correlação negativa significativa entre o SUV e a FEVE nos grupos Doxo, Tm, Tm+Doxo e quando todos os grupos foram analisados em conjunto (Figura 16). Além disso, o SUV na S2 se correlaciona negativamente com a FEVE na S6 ($r = -0,62$, $p < 0,001$).

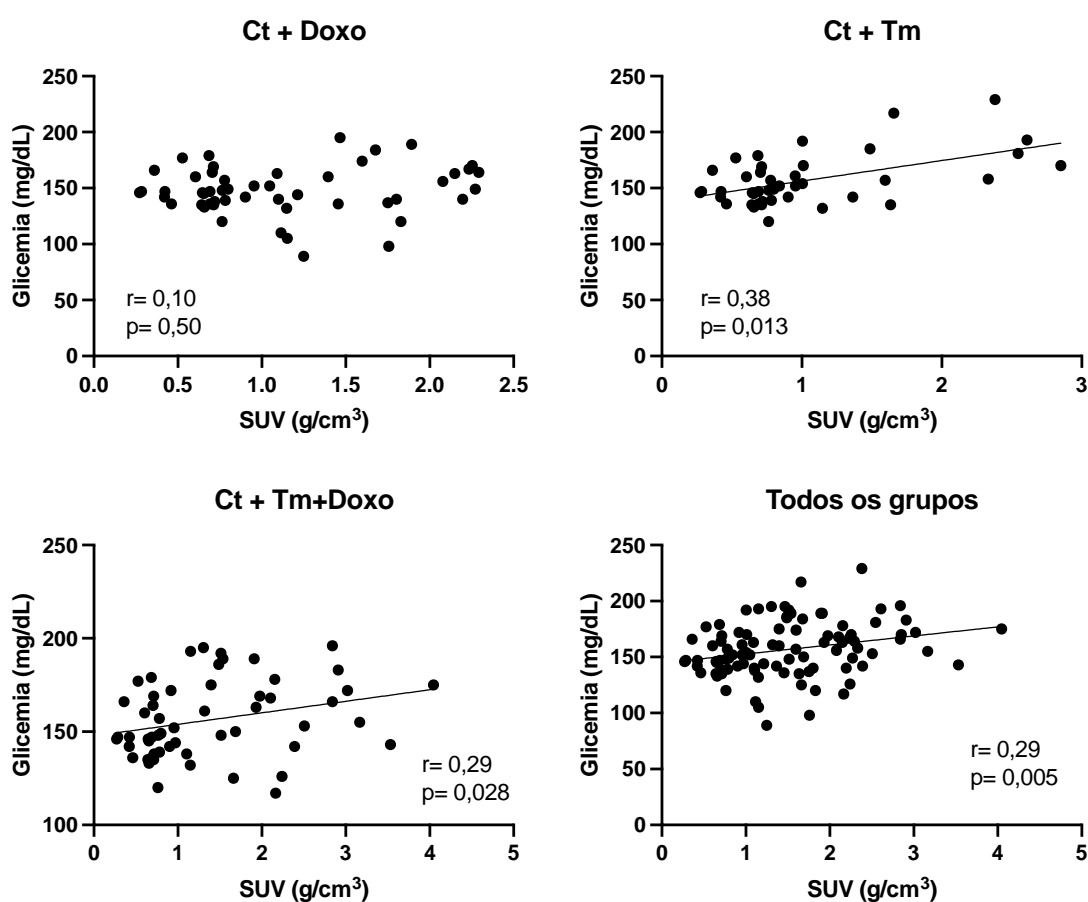
Figura 16 - Gráficos de dispersão ilustrando a correlação entre a FEVE E SUV



Abreviações: Ct = Controle; Doxo = Doxorubicina; Tm = Tumor; Tm+ Doxo = Tumor + Doxorubicina; FEVE= fração de ejeção de ventrículo esquerdo; SUV= valor padronizado de captação. Os dados são expressos como média \pm S.E.M. * = $p < 0,05$.

Não foi observada correlação significativa entre o SUV e a glicemia sanguínea pré ^{18}F -FDG no grupo Doxo. Entretanto, foi observada correlação significativa entre o SUV e a glicemia nos grupos Tm e Tm+Doxo. Também foi observada correlação significativa entre o SUV e a glicemia quando todos os grupos foram analisado em conjunto (Figura 17). Não foi observada correlação significativa entre SUV e a variação de glicemia durante a imagem em nenhum grupo ou quando considerado todos os grupos.

Figura 17 - Gráficos de dispersão ilustrando a correlação entre a Glicemia E SUV



Abreviações: Ct = Controle; Doxo = Doxorubicina; Tm = Tumor; Tm+ Doxo = Tumor + Doxorubicina; SUV= valor padronizado de captação. Os dados são expressos como média \pm S.E.M. * = $p < 0,05$.

Considerando as imagens miocárdicas da S6 e a análise histológica, não foi observada correlação significativa entre o SUV e o estresse oxidativo ($r = 0,24$, $p = 0,245$) ou intensidade de inflamação tecidual ($r = -0,06$, $p = 0,98$).

Já a função sistólica ventricular esquerda se correlacionou também com a intensidade de estresse oxidativo tecidual ($r = -0,46$, $p = 0,019$) e houve uma tendência de se correlacionar com a inflamação miocárdica ($r = -0,35$, $p = 0,07$). Houve correlação moderada de ROS com a inflamação miocárdicas ($r = 0,45$, $p = 0,025$).

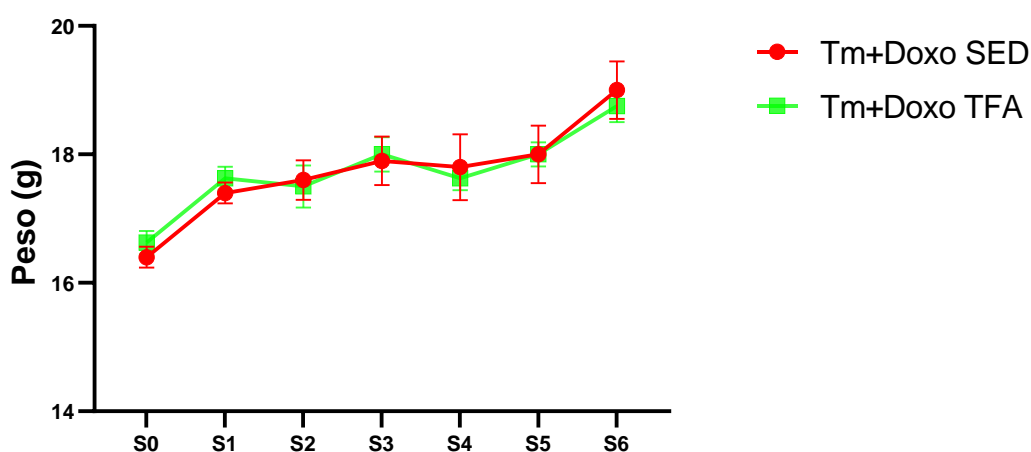
6.2 Segunda etapa: Efeito cardioprotetor do TFA

6.2.1 Avaliação clínica e de mortalidade:

No decorrer do estudo, observou-se que alguns animais nos grupos Tm+ Doxo SED e Tm+Doxo TFA desenvolveram hiperpigmentação nas unhas, plantas dos pés e na cauda. Não foi observada diferença significativa na intensidade da hiperpigmentação entre os grupos Tm+Doxo TFA.

Em relação ao peso corporal dos animais durante o TFA, foi observado um ganho progressivo ao longo das semanas, especialmente nas semanas S1 e S6, em comparação com a semana S0 ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos ao longo das semanas, como demonstrado na Figura 18.

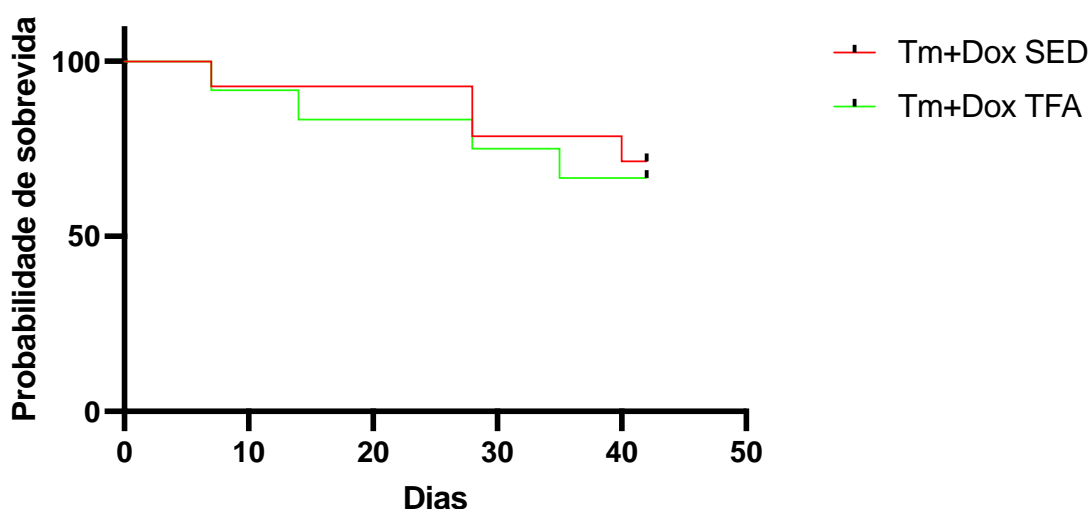
Figura 18 - Peso corporal dos animais durante o TFA



Representação gráfica do peso corporal dos animais durante as semanas de experimento. Abreviações: Tm + Doxo SED= Tumor+ Doxorubicina Sedentário; Tm + Doxo TFA = Tumor+ Doxorubicina Treinamento físico aeróbico; g= gramas; S= Semana. Os dados são expressos como média \pm S.E.M.

O tratamento com Doxo e a presença do Tm, quando associados, têm o potencial de causar efeitos colaterais intensos. Portanto, durante a intervenção com o TFA, foram avaliadas as perdas de animais tanto no grupo treinado quanto no grupo sedentário. Conforme mencionado anteriormente, no grupo Tm+Doxo SED, houve uma taxa de mortalidade de 28,6%. No grupo Tm+Doxo+TFA, foram observadas quatro mortes (33,3%), sendo duas na semana S4 e duas na semana S5. Na análise de sobrevivência pela curva de Kaplan-Meier, não foi observada diferença significativa entre os grupos, como mostrado na Figura 19.

Figura 19 - Probabilidade de sobrevivência durante o experimento TFA



Representação gráfica da probabilidade de sobrevivência durante as semanas de experimento. Abreviações: Tm + Doxo SED= Tumor+ Doxorubicina Sedentário; Tm + Doxo TFA = Tumor+ Doxorubicina Treinamento físico aeróbico. Os dados são expressos como média \pm S.E.M.

6.2.2 Função sistólica e morfologia ventricular esquerda pelas imagens PET sincronizadas com o ECG

Os dados evolutivos da função sistólica e da morfologia do ventrículo esquerdo nos animais dos diferentes grupos que sobreviveram até o final do estudo são apresentados na tabela 5.

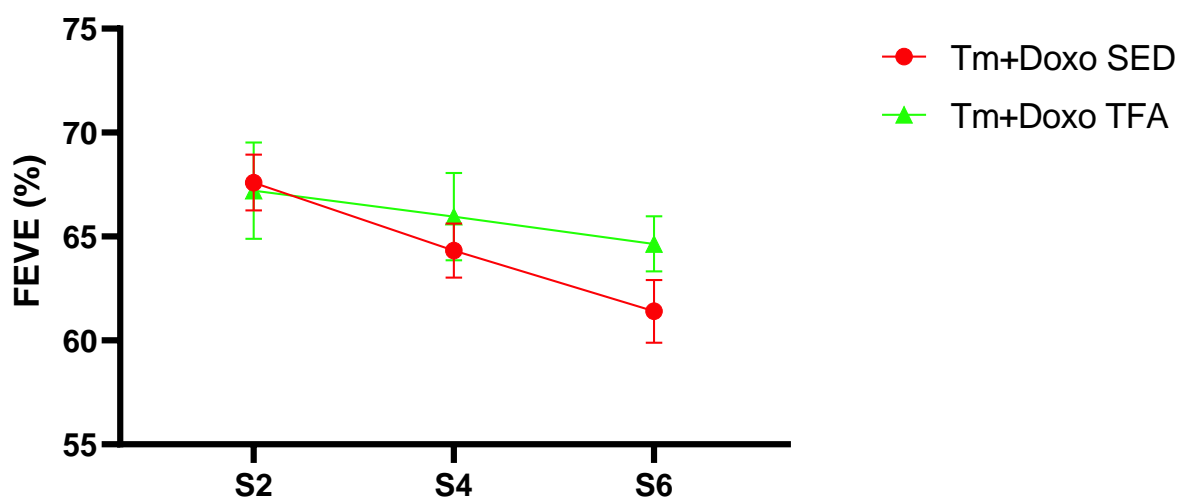
Tabela 5 - Sumário dos resultados da avaliação da função sistólica e morfologia ventricular esquerda dos animais.

Variáveis	<i>Tm+doxo SED</i> (n= 10)	<i>Tm+doxo TFA</i> (n= 6)	Valor P
FEVE (%)			
S2	67,6±1,34	67,2±2,30	
S4	64,33±1,3*	66±2,10	
S6	61,41±1,51*	64,3±1,5	P = 0,327
VDFVE (μl)			
S2	25,59±1,41	30,1±1,17	
S4	28,22±1,1	29±1,4	
S6	27,12±1,05	29,8±1,44	P= 0,246
VSFVE (μl)			
S2	8,3±0,64	10±1,05	
S4	10,2±0,72	10±0,80	
S6	10,43±0,51	10,64±0,72	P= 0,407
Volume sistólico (μl)			
S2	17,3±0,95	20,15±0,40	
S4	18,05±0,49	19,13±1,016	
S6	16,68±0,83	19,15±1	P= 0,484
Frequência cardíaca (bpm)			
S2	265±10,9	287±25,3	
S4	306,7±6,6	293±16,25	
S6	266±11,15	269±9	P= 0,423
Débito cardíaco (ml)			
S2	4,6±0,29	5,8±0,50	
S4	5,5±0,19*	5,6±0,46	
S6	4,4±0,26†	5,2±0,40	P= 0,265

Os dados são apresentados como média±SEM. Abreviações: Controle (Ct), Doxorubicina (Doxo), Tumor (Tm). FEVE= fração do ventrículo esquerdo; VDFVE= volume diastólico final do ventrículo esquerdo; VSFVE= volume sistólico final do ventrículo esquerdo. Valor de P se refere ao efeito principal no teste de ANOVA mista. *p≤0.05 vs. S1 do mesmo grupo, † p≤0.05 vs S4 do mesmo grupo, Teste de comparação múltipla de Šidák.

Como pode ser observado na Tabela 5 e Figura 20, houve queda progressiva da FEVE no grupo Tm+Doxo SED e queda de menor intensidade no Tm+Doxo TFA. No grupo Tm+Doxo SED foi observada uma redução significativa da FEVE quando comparado a S2 vs S4 ($P= 0,036$) e S2 vs S6 ($p=0,05$). No grupo Tm+ Doxo TFA, não houve diferença significativa em nenhuma semana quando comparadas a S2. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas da FEVE entre os grupos em nenhuma janela temporal. Não foram observadas diferenças significativas entres os grupos nas demais variáveis das imagens sincronizadas com o ECG.

Figura 20 - Avaliação da FEVE durante o TFA



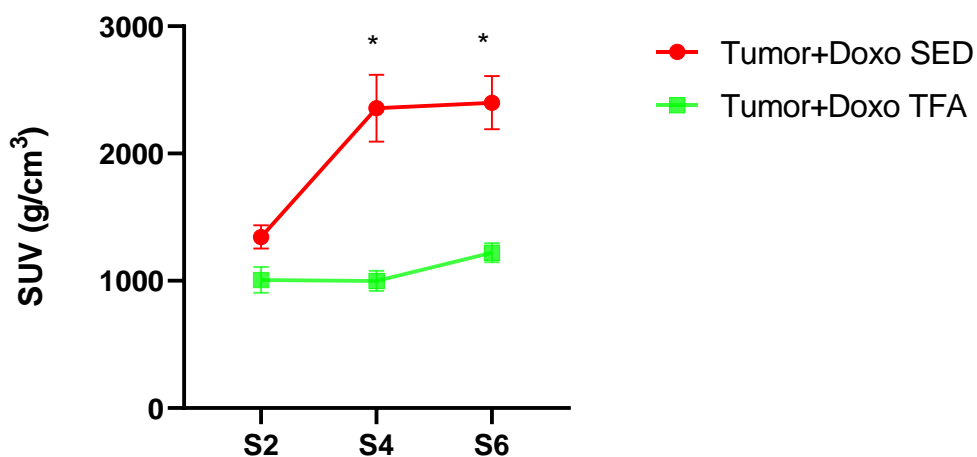
Representação gráfica da FEVE dos animais durante as S2, S4 e S6 do experimento. Abreviações: Tm + Doxo SED= Tumor+ Doxorubicina Sedentário; Tm + Doxo TFA = Tumor+ Doxorubicina Treinamento físico aeróbico; FEVE = fração de ejeção do ventrículo esquerdo; TFA = treinamento físico aeróbico; S= semana. Os dados são expressos como média \pm S.E.M. * = $p<0,05$.

6.1.3 Análise do metabolismo miocárdico do ventrículo esquerdo

A partir das imagens ^{18}F -FDG estáticas, foi avaliado o metabolismo miocárdico do ventrículo esquerdo (Figura 21). Desde a S2, os animais do grupo Tm+Doxo SED apresentaram maior SUV em relação ao Tm+Doxo TFA; porém, sem atingir diferença estatisticamente significativa. Em relação à semana 2, foi observado aumento da captação miocárdica de ^{18}F -FDG na S2 vs S4 ($p= 0,004$) e na S2 vs S6 ($p=0,002$) do

grupo de animais sedentários enquanto o grupo Tm+Doxo TFA não apresentou aumento do metabolismo da glicose ao longo do experimento.

Figura 21 - Captação do SUV no ventrículo Esquerdo durante o TFA

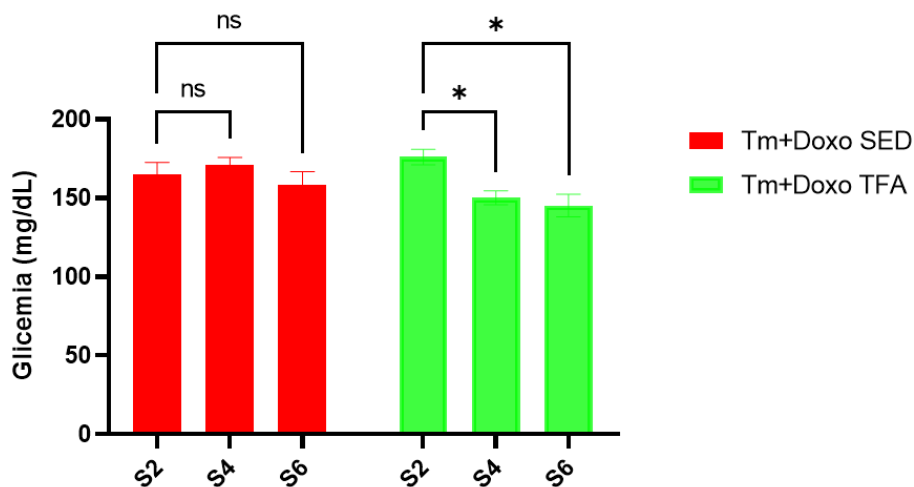


Representação gráfica da captação de SUV no VE. Abreviações: Tm + Doxo SED= Tumor+ Doxorubicina Sedentário; Tm + Doxo TFA = Tumor+ Doxorubicina Treinamento físico aeróbico; s = semana; SUV= valor padronizado de captação. Os dados são expressos como média \pm S.E.M. * = $p < 0,05$ vs S2 do mesmo grupo.

6.2.4 Glicemia sanguínea

Na avaliação ao longo do tempo, foi observado que o grupo Tm+Doxo TFA apresentou menores valores de glicemia na S4 ($p = 0,013$) e S6 ($p = 0,041$) quando comparado à S2 (figura 22). Na comparação entre grupos, foi observada diferença significativa na glicemia pré administração do ^{18}F -FDG somente na S4 ($p = 0,019$).

Figura 22 - Glicemia Sanguínea durante o TFA



Representação gráfica da glicemia pré realização da imagem PET dos animais. Abreviações: Tm + Doxo SED= Tumor+ Doxorubicina Sedentário; Tm + Doxo TFA = Tumor+ Doxorubicina Treinamento físico aeróbico; s = semana; PET = Tomografia por emissão de pósitrons. Os dados são expressos como média \pm S.E.M. * = $p < 0,05$.

6.2.5 Avaliação do crescimento e metabolismo da glicose tumoral

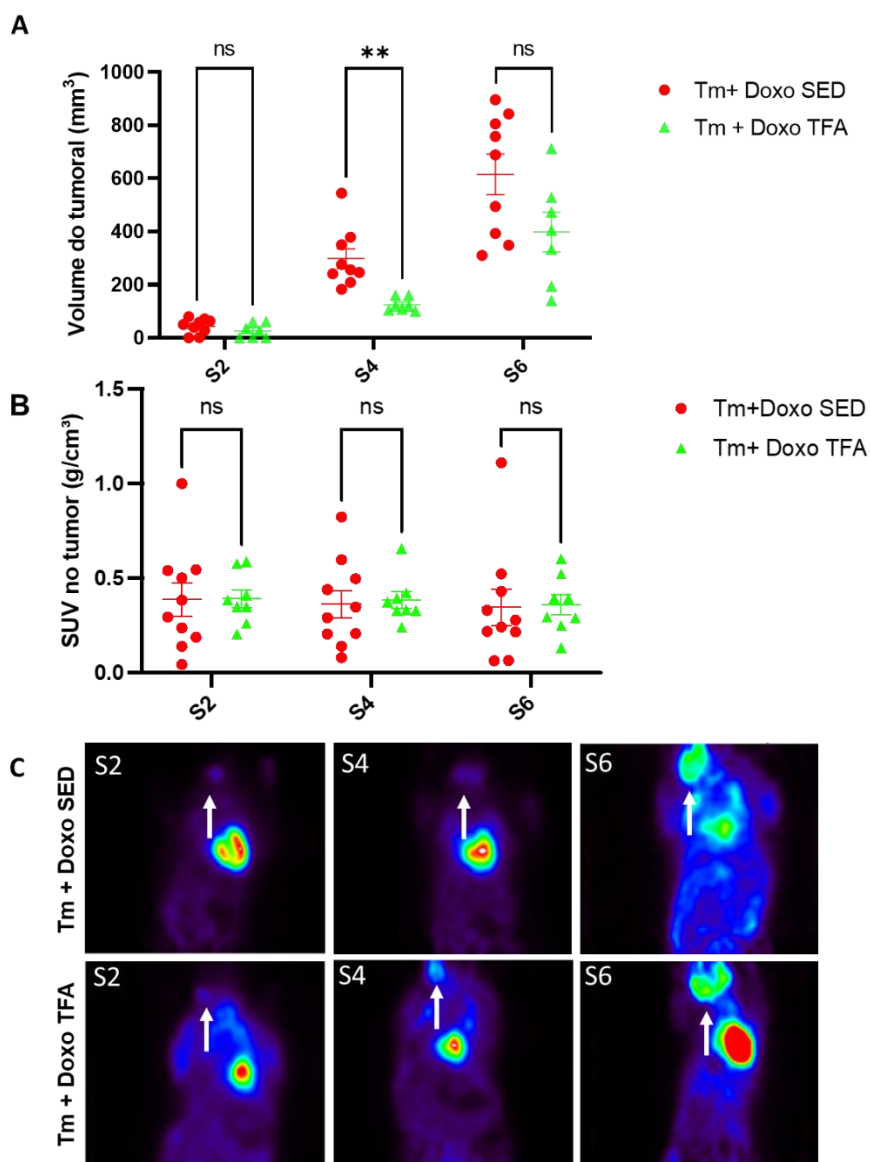
Para avaliar o crescimento e desenvolvimento do tumor, o mesmo foi mensurado na S2, S4 e S6 após a inoculação pelas imagens de ^{18}F -FDG. Na S2 a média do volume do tumor do grupo Tm+Doxo SED, foi de $43,79 \pm 9,668 \text{ mm}^3$; na S4 foi $298,4 \pm 76,43 \text{ mm}^3$ e na S6 $615,3 \pm 76,43 \text{ mm}^3$. No grupo Tm+Doxo TFA as S2 a média foi de $26,50 \pm 10,30 \text{ mm}^3$, na S4 $124,7 \pm 9,590 \text{ mm}^3$ e na S6 $398,4 \pm 74,58 \text{ mm}^3$. No grupo Tm+ Doxo SED Houve diferença significativa S2 vs S4 ($P=0,0003$) e S2 vs S6 ($P=0,0003$). No grupo Tm+ Doxo TFA foi observada diferença significativa entre S2 vs S4 ($P=0,002$) e S2 vs S6 ($P=0,007$).

Na comparação entre os grupos, foi observada diferença significativa na S4 ($p=0,004$) onde o grupo Tm+Doxo TFA apresentou menor tamanho de tumor. Entretanto, tal diferença foi perdida na S6.

A captação de ^{18}F -FDG no tumor foi mensurada na S2, S4 e S6 através das imagens PET. No grupo Tm+Doxo SED a captação de ^{18}F -FDG na S2 foi de $0,388 \pm 0,087 \text{ g/cm}^3$, reduziu para $0,363 \pm 0,12 \text{ g/cm}^3$ na S4 e reduziu para $0,348 \pm 0,096 \text{ g/cm}^3$ na S6. No grupo Tm +Doxo TFA, a captação foi de $0,39 \pm 0,048 \text{ g/cm}^3$ na S2,

$0,38 \pm 0,043 \text{ g/cm}^3$ na S4 e $0,36 \pm 0,054 \text{ g/cm}^3$ na S6. Não houve diferença significativa nos fatores Tempo, Grupo e GrupoxTempo. (figura 23 B).

Figura 23 - Avaliação do Crescimento e atividade Tumoral durante o TFA



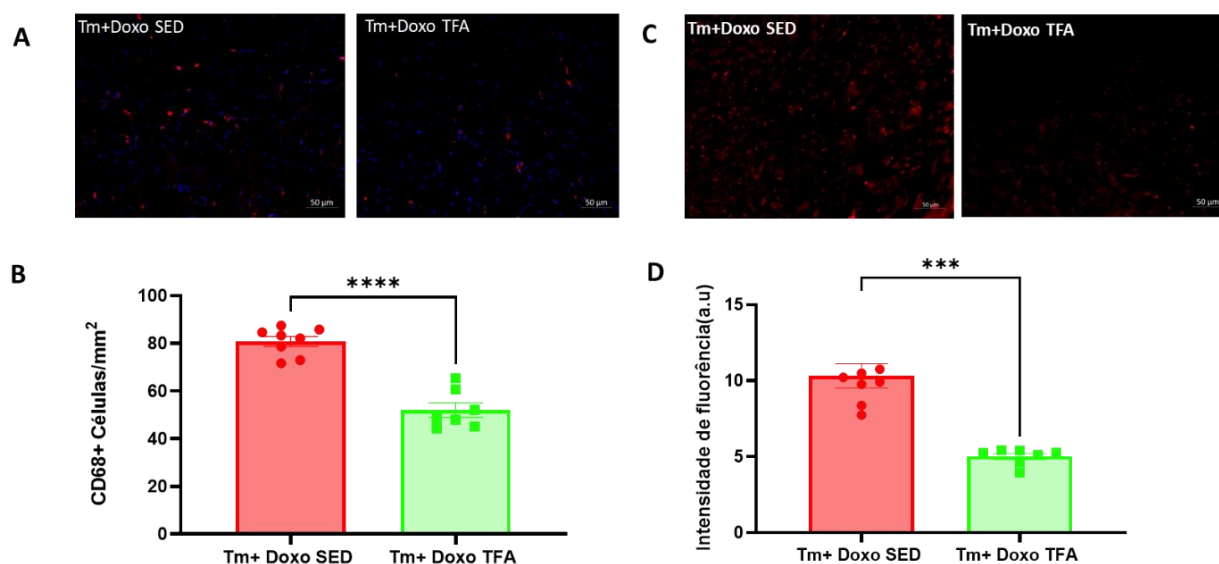
(A) Representação gráfica do crescimento tumoral ao longo das S2, S4 e S6 após inoculação das células. (B) Representação gráfica do SUV ao longo das S2, S4 e S6 após inoculação das células. (C) representação ilustrativa do crescimento tumoral ao longo das S2, S4 e S6 após inoculação das células. Abreviações: Tm + Doxo SED= Tumor+ Doxorubicina Sedentário; Tm + Doxo TFA = Tumor+ Doxorubicina Treinamento físico aeróbico; s = semana; SUV= valor padronizado de captação.Os dados são expressos como média \pm S.E.M. * = $p < 0,05$.

6.2.6 Avaliação da produção de ROS e da inflamação miocárdica

Em relação à inflamação miocárdica, foi observado que o grupo de animais submetidos ao treinamento físico apresentou menor intensidade de intensidade de inflamação quando comparado ao grupo de animais sedentários ($p < 0,001$) (figura 24 A e B).

Na análise histológica, o grupo de animais submetidos ao TFA apresentou menor produção de ROS quando comparado ao grupo de animais sedentários ($p = 0,003$) (figura 24 C e D).

Figura 24 - Avaliação da Inflamação e produção de ROS durante o TFA



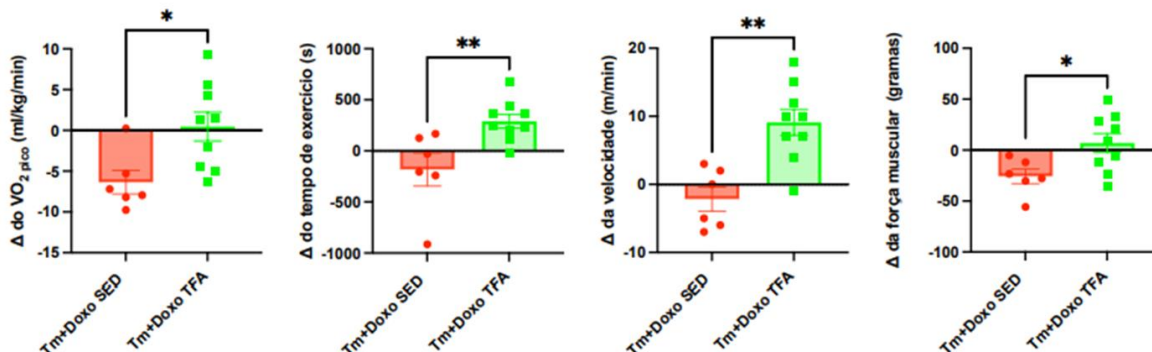
(A) Figura representativa da quantidade de macrófagos nos cardiomiócitos dos grupos Tm+ Doxo SED e Tm+ Doxo TFA. (B) Representação gráfica de macrófagos nos cardiomiócitos, refletindo a quantidade de inflamação presente no coração. (C) Figura representativa da imunofluorescência para ROS nos cardiomiócitos dos grupos Tm+ Doxo SED e Tm+ Doxo TFA. (D) Representação gráfica da intensidade de fluorescência emitida pela sonda DHE, que reflete a quantidade de ROS presente no coração. Abreviações: Tm + Doxo SED= Tumor+ Doxorubicina Sedentário; Tm + Doxo TFA = Tumor+ Doxorubicina Treinamento físico aeróbico. Os dados são expressos como média \pm S.E.M. * $p < 0.05$.

6.2.7 Capacidade cardiorrespiratória e força muscular

No teste de capacidade cardiorrespiratória (TCP), observou-se que o grupo Tm+Doxo SED apresentou uma redução do $VO_{2\text{pico}}$ após o período de seguimento em comparação com o grupo Tm+Doxo TFA ($p = 0,017$). Além disso, o grupo de animais submetidos ao TFA aumentou o tempo de exercício ($289,1 \pm 201,67$ s), enquanto o grupo sedentário apresentou uma redução ($-182,67 \pm 395,49$ s, $p = 0,009$). Como resultado, o grupo Tm+Doxo TFA aumentou a velocidade atingida no TCP em comparação com o grupo Tm+Doxo SED ($9,1 \pm 5,7$ vs $-2,2 \pm 4,4$ m/min, $p = 0,001$).

Foi observado que o TFA também foi capaz de impedir a redução da força muscular esquelética demonstrada no grupo sedentário após o período de seguimento (Figura 25). O grupo Tm+Doxo SED apresentou redução da força muscular ao longo das cinco semanas, com diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0259$) em comparação aos grupos.

Figura 25 - Capacidade cardiorrespiratória e força muscular durante o TFA



Representação gráfica da variação do $VO_{2\text{pico}}$, tempo de exercício, velocidade pico, e força muscular dos grupos Tm+Doxo SED e Tm+Doxo TFA. Abreviações: Tm + Doxo SED= Tumor+ Doxorubicina Sedentário; Tm + Doxo TFA = Tumor+ Doxorubicina Treinamento físico aeróbico; $VO_{2\text{pico}}$ = maior taxa de consumo de oxigênio durante o exercício. Os dados são expressos como média \pm S.E.M. * $p < 0,05$.

7. DISCUSSÃO

7.1 Principais achados

Através da utilização de métodos de imagens realizada de maneira seriada e seguida da análise histológica correlacionando com as imagens *in vivo*, demonstramos achados importantes e relevantes sobre a cardiotoxicidade desenvolvida em um modelo murino de câncer de mama.

Observamos que a redução da FEVE e o aumento da captação de ^{18}F -FDG no miocárdio neste modelo são compatíveis com o desenvolvimento da cardiotoxicidade e as características são semelhantes às encontradas em humanos.

Identificamos através da análise histológica um aumento da produção de ROS e inflamação nos grupos que foram submetidos ao tratamento com Doxo. Observamos ainda que a produção de ROS parece ser um potente mecanismo para redução da FEVE.

Observamos também que os animais submetidos ao TFA, apresentaram menores níveis circulantes de glicemia, menor captação miocárdica de FDG, com menor intensidade da queda da FEVE. Essas alterações podem ser suportadas por uma redução na produção de ROS e na inflamação miocárdica quando comparados ao grupo não treinado.

Documentamos que o TFA demonstrou ser uma estratégia potente para atenuar a cardiotoxicidade por Doxo, aumentar a capacidade de exercício, impedir a redução da força muscular esquelética.

7.2 Caracterização do modelo

O presente estudo mostrou que o modelo utilizado para o desenvolvimento da cardiotoxicidade consiste em resultados semelhantes aos encontrados em outros estudos. Alguns modelos de cardiotoxicidade já foram desenvolvidos, mas poucos associaram o uso da Doxo com as células tumorais e os principais mecanismos envolvidos neste modelo de cardiotoxicidade (JIANG; DU; MENG; ZHANG *et al.*, 2018). Com o objetivo de estudar um modelo semelhante à cardiotoxicidade observada em humanos, utilizamos um modelo crônico de cardiotoxicidade, com

tratamento semanal, com uma dose de 5mg/kg, semelhante à que é utilizada no tratamento oncológico humano (10 – 80mg/m²) (GABIZON; SHMEEDA; BARENHOLZ, 2003) e células tumorais classificadas como luminal B ER+, PR+/-, HER+), subtipo mais frequente de câncer de mama em humanos (REGEV; KIZNER; RONCATO; DADIANI *et al.*, 2022). Dessa forma, padronizamos um modelo de cardiotoxicidade mais realístico e semelhante à situação observada em humanos.

A cardiotoxicidade foi confirmada através da redução da FEVE nos grupos Tm+Doxo e Doxo, associada ao aumento da captação de FDG, estresse oxidativo e inflamação. Houve percentualmente uma maior queda da FEVE, embora sem significância estatística, no grupo Doxo. Provavelmente essa maior queda da FEVE neste grupo poderia ser explicada pela maior produção de ROS e inflamação no miocárdio desses animais. Uma hipótese é que com a ausência do tumor, há um maior acúmulo de Doxo nos miócitos, que ocorre em menor intensidade em animais com tumor, pois uma porcentagem da droga é destinada às células tumorais.

Interessantemente, no grupo Tm foi observada uma redução da FEVE associada ao aumento da captação de FDG. Esses resultados se assemelham aos observados no estudo de Thackeray *et al.* (2017) que observou atrofia cardíaca associada a aumento da captação miocárdica de ¹⁸F-FDG proporcional ao crescimento tumoral em um modelo com células de carcinoma de cólon (C26) comparado a animais controles. Os autores observaram que essa mudança metabólica estava associada à redução dos níveis de triglicerídeos cardíacos e aumento da expressão de GLUT1 e GLUT4, embora os níveis de insulina plasmática estivessem reduzidos. Em contraste, neste mesmo estudo, um modelo de células de melanoma também induziu atrofia cardíaca, mas com redução progressiva da captação de FDG. Os autores observaram que neste modelo, além da redução de insulina e dos triglicerídeos cardíacos, os animais possuíam redução da expressão de GLUT4 (THACKERAY; PIETZSCH; STAPEL; RICKE-HOCH *et al.*, 2017). Dessa forma, esses resultados, em conjunto com os resultados do presente estudo, indicam que diferentes tipos de células cancerígenas podem induzir diferentes respostas metabólicas nos cardiomiócitos e que esta deve ser levada em consideração na interpretação dos resultados das imagens ¹⁸F-FDG.

O ¹⁸F-FDG PET é uma ferramenta de imagem utilizada rotineiramente para o monitoramento de pacientes em tratamento oncológico. Além de fornecer informações

importantes sobre o estadiamento do câncer pode ser utilizado para o diagnóstico precoce de cardiotoxicidade induzida por Doxo. (PAYDARY; SERAJ; ZADEH; EMAMZADEHFARD *et al.*, 2019). A análise do metabolismo miocárdico do ventrículo esquerdo apresentou um maior SUV nos grupos tratados com Doxo. Um estudo realizado por Bauckneht e colaboradores (2017) mostrou um comportamento semelhante em seu estudo translacional. No estudo *in vivo* foi observado que a Doxo induz aumento de captação de glicose cardíaca sem alterar o peso dos animais e os níveis glicêmicos. Observaram ainda um aumento do SUV de forma dose dependente, ou seja, foi observado um aumento progressivo ao longo do tratamento.

No estudo clínico retrospectivo realizado com um banco de dados, foi observado um comportamento parcialmente semelhante ao encontrado no experimento animal. Existe uma tendência de aumento da captação ^{18}F -FDG, mas o efeito da Doxo foi heterogêneo entre os grupos (BAUCKNEHT; FERRARAZZO; FIZ; MORBELLI *et al.*, 2017). Dessa forma, os autores relataram que este achado pode ser a resposta metabólica observada e possa ser um marcador precoce de toxicidade cardíaca, sendo capaz de diagnosticar precocemente disfunção cardíaca. De fato, nossos dados corroboram essa hipótese uma vez que a intensidade do SUV se correlacionou negativamente com FEVE. Além disso, observamos ainda que o SUV na S2 se correlacionou negativamente com a FEVE na S6. Um estudo realizado através da análise de prontuários de pacientes portadores de linfoma de Hodgkin demonstrou que o uso da Doxo aumentou a captação cardíaca de ^{18}F -FDG e que foi associada a queda da FEVE (SAROCCHI; BAUCKNEHT; ARBOSCELLO; CAPITANIO *et al.*, 2018).

Observamos neste modelo uma baixa mortalidade, o grupo Tm+Doxo teve uma porcentagem de mortalidade levemente maior do que o grupo Doxo, possivelmente por ser um modelo com células tumorais associado ao tratamento com Doxo. Acreditamos que essa diferença do percentual de mortalidade do grupo Tm+Doxo foi maior por ser um modelo que recebeu células tumorais. As células tumorais E0771 utilizadas no estudo são proliferativas e com característica de disseminação metastática, preferencialmente nos pulmões, peritônio, ossos, cérebro, diafragma e intestinos (LE NAOUR; ROSSARY; VASSON, 2020). Além disso, a baixa mortalidade, pode ser associada à via de administração da Doxo. Neste estudo foi utilizado a via intravenosa. A administração da Doxo nesta via é considerada de difícil execução,

aumenta o risco de flebite e necrose caudal enquanto que a via intraperitoneal, que é considerada de fácil administração, pode causar lesão peritoneal e aumentar o risco de morte, peritonite e ascite. Vale ressaltar que essa via pode influenciar nos resultados dos experimentos em caso de lesão peritoneal que pode ocorrer comprometimento na absorção do medicamento (MENG; FAN; WANG; WANG *et al.*, 2022).

Durante o estudo observamos que a maioria dos animais que receberam tratamento com Doxo apresentaram uma hiperpigmentação na cauda, patas dianteira e traseira. Na literatura é bem documentado os efeitos colaterais comuns ao tratamento como vômitos, alopecia, erupções cutâneas (ALAM KHAN; JAWAID AKHTAR, 2022). Um efeito pouco abordado é a hiperpigmentação. Não observamos estudos que tenham relatado tais características em modelo animal. Entretanto, poucos estudos documentaram essas características em humanos. Um estudo realizado com 42 pacientes submetidos ao tratamento com Doxo, com uma dose acumulativa de 500 mg/Kg, observou que alguns pacientes apresentaram hiperpigmentação nas unhas e leitos da unha dos dedos das mãos e pés. Essas manifestações foram observadas entre seis e oito semanas após do início do tratamento (ALAGARATNAM; CHOI; ONG, 1982).

Em nosso estudo, todos os animais ganharam peso ao longo do experimento, mesmo os grupos que foram tratados com Doxo. O ganho de peso foi menor nos grupos que receberam tratamento com Doxo. Apenas o grupo Tm teve um ganho de peso maior nas últimas semanas do experimento. O aumento do tumor nas últimas semanas fez com que o animal apresentasse um peso maior. Infelizmente não foi possível saber o peso real do animal sem o tumor. Um estudo realizado por Oudote colaboradores (2021), utilizou um modelo experimental com ratos, tratados com a mesma dose de Doxo deste estudo, administrada intravenosamente, com uma dose acumulativa de 15mg/Kg. Os autores observaram uma redução significativa no peso dos animais ($p < 0,01$) na semana 2 de tratamento e ($p < 0,001$) na semana 4 e 6 (OUDOT; COURTEAU; GUILLEMIN; VRIGNEAUD *et al.*, 2021). Um outro estudo realizado por Haesen e colaboradores (2024), estudou um modelo de cardiotoxicidade em ratos tratados com uma dose de 2mg/Kg por 8 semanas, uma dose acumulativa de 16mg/Kg. Os autores observaram, em concordância com o estudo anterior, uma redução significativa do peso desde o início do tratamento (HAESEN; JAGER;

BRILLOUET; DE LAAT *et al.*, 2024). Uma hipótese para o aumento do peso dos animais no nosso estudo pode estar na diferença entre ratos e camundongos, boas condições sanitárias e um bom enriquecimento ambiental. Mantendo os animais em boas condições evita o estresse dos animais e possivelmente a perda de peso.

O estresse oxidativo e a inflamação são os principais responsáveis por danos cardíacos causados por Doxo (FABIANI; AIMO; GRIGORATOS; CASTIGLIONE *et al.*, 2021; SONGBO; LANG; XINYONG; BIN *et al.*, 2019). O estresse oxidativo é considerado por diversos pesquisadores como o principal mecanismo da cardiotoxicidade induzida por Doxo. Geralmente, é observado um desequilíbrio entre ROS e antioxidantes que leva ao estresse oxidativo e depleção energética (SONGBO; LANG; XINYONG; BIN *et al.*, 2019). Em um estudo realizado por Yang e colaboradores (2020) observaram também que a Doxo aumenta a produção de ROS (YANG; HSIEH; HUNG; CHENG *et al.*, 2020). Nossos dados corroboram os estudos anteriores. Em nosso estudo observamos um aumento da produção de ROS, o qual foi correlacionado negativamente com a FEVE.

Neste estudo foi observado o aumento significativo de macrófagos M1 (CD68+), fase inicial de inflamação no tecido do ventrículo esquerdo que foi correlacionado ao estresse oxidativo. Zhang, Xu e colaboradores (2020) também observaram infiltrado de macrófagos no tecido cardíaco de animais tratados com uma dose total de 15 mg/Kg (ZHANG; XU; SUN; YANG *et al.*, 2020). Entretanto, não observamos correlação significativa da inflamação com a FEVE.

7.2 Efeito cardioprotetor do TFA

O treinamento físico promove diversos benefícios para o sistema cardiovascular, como a redução da mortalidade (DOLINSKY; ROGAN; SUNG; ZORDOKY *et al.*, 2013). Atualmente, o treinamento aeróbico tem sido alvo de estudo e recomendado como um potente cardioprotetor não farmacológico contra lesões miocárdicas induzida por Doxo (KOUZI; UDDIN, 2016; MARQUES-ALEIXO; SANTOS-ALVES; MARIANI; RIZO-ROCA *et al.*, 2015).

O consumo máximo de oxigênio durante o exercício ($VO_{2\text{ máx}}$) é uma medida importante para avaliar a capacidade funcional e a redução do $VO_{2\text{ máx}}$ está diretamente relacionado com IC e aumento da mortalidade (HOWDEN; BIGARAN; BEAUDRY; FRASER *et al.*, 2019). Em nosso estudo, utilizamos um protocolo de treinamento de

intensidade baixa a moderada de 40-50% do $VO_{2\text{pico}}$ obtido através da do TCP para a prescrição adequada para o TFA. Demonstramos que TFA não foi capaz de impedir a queda da FEVE, porém em comparação ao grupo sedentário, a redução FEVE foi menor, mas não atingiu nível de significância. Em consonância com os nossos resultados, Gomes e colaboradores (2021) obtiveram um resultado semelhante. Neste estudo, foi realizado o TFA com a mesma intensidade (40 – 50% da capacidade máxima), por 40 min por sessão, 4 dias por semana durante 5 semanas, realizado com camundongos C57bl/6J machos, dose acumulada de Doxo de 25mg/Kg. (GOMES-SANTOS; JORDAO; PASSOS; BRUM *et al.*, 2021). Eles observaram que o TFA não preservou a FEVE e nem reduziu a fibrose. No entanto, o TFA preservou a tensão circunferencial miocárdica, aliviou a atrofia cardíaca e restaurou a área transversal dos cardiomiócitos, além de diminuiu a intolerância ao exercício induzida pela Doxo. Acreditamos que o TFA não protegeu a queda da FEVE devido a intensidade do TFA e o momento que foi iniciado o treinamento.

Avaliamos o metabolismo cardíaco dos animais treinados e sedentários utilizamos o ^{18}F -FDG. Observamos em nosso estudo que os animais submetidos ao TFA não apresentaram aumento significativo da captação de ^{18}F -FDG no miocárdio. Uma hipótese para esse resultado é o efeito cardioprotetor de TFA no miocárdio. Essa hipótese é suportada pela redução da produção de ROS e inflamação.

O exercício aeróbico aumenta a expressão de enzimas antioxidante no músculo cardíaco e esquelético e regula positivamente os sistemas antioxidantes. A regulação das enzimas antioxidantes permite a redução de ROS e preserva a função mitocondrial no musculo cardíaco tratado com Doxo (GAYTAN; LAWAN; CHANG; NURUNNABI *et al.*, 2023). Observamos em nosso estudo que os animais submetidos ao TFA reduziram os níveis de ROS significativamente. Esses dados corroboram os resultados de Marques e colaboradores (2015) que em seu estudo com modelo murino cardiotoxicidade mostrou que o treinamento pré e pós tratamento reduziu os níveis de ROS (MARQUES-ALEIXO; SANTOS-ALVES; MARIANI; RIZO-ROCA *et al.*, 2015). Além disso, um estudo realizado por Smurd e colaboradores (2011) com ratos tratados com Doxo e submetidos ao treinamento aeróbico com intensidade de 70% da capacidade máxima observou que a produção de ROS foi reduzida no musculo esquelético (SMUDER; KAVAZIS; MIN; POWERS, 2011). Vale ressaltar que observamos em nosso estudo que o TFA contribuiu para a redução da inflamação

corroborando com os achados de Yang e colaboradores (2020). Esses autores encontraram resultados semelhantes em seu estudo com exercício aeróbico precoce de intensidade moderada reduzindo a resposta inflamatória e conseqüentemente fibrose miocárdica(YANG; HSIEH; HUNG; CHENG *et al.*, 2020) .

O presente estudo avaliou ainda os aspectos clínicos dos animais tratados com Doxo e submetidos ao TFA. Os animais dos grupos Tm+Doxo SED e Tm+Doxo TFA apresentaram hiperpigmentação nas unhas, plantas dos pés e na cauda. Não foi observado diferença entre os grupos, com isso TFA não minimizou a hiperpigmentação provocada pela Doxo. A hiperpigmentação, conhecida como toxicidade ungueal é um efeito adverso cutâneos provocados pelo tratamento oncológico (SARASWAT; SOOD; VERMA; KUMAR *et al.*, 2020). Não foi encontrado estudos que relataram os efeitos do TFA e a hiperpigmentação. Uma hipótese para o TFA não ter influenciado na presença da hiperpigmentação nos animais é o pouco tempo de treinamento. O TFA foi realizado por 5 semanas, talvez se tivesse realizado por mais tempo e uma intensidade maior, poderia ter observado benéficos sobre a hiperpigmentação.

Observamos neste estudo que o peso dos animais aumentou ao longo dos experimentos, nos grupos Tm+Doxo SED e Tm+Doxo TFA. Corroborando com os nossos resultados, Ghignatti e colaboradores (2022) observaram em seu estudo um comportamento semelhante ao nosso. Utilizaram uma dose acumulativa de 16mg/Kg e os animais foram submetidos ao treinamento físico e apresentaram ganho de peso médio maior do que os sedentários (GHIGNATTI; RUSSO; BECKER; GUECHEVA *et al.*, 2022). Além disso, foi observamos uma taxa de mortalidade maior no grupo Tm+Doxo TFA comparado ao grupo Tm+ Doxo SED, mas que não atingiu significância estatística. Uma justificativa para a taxa maior de mortalidade no grupo treinado foi que uma morte ocorreu durante o primeiro tratamento e as outras três mortes ocorreram após a realização das imagens, possivelmente devido ao efeito do anestésico.

Um achado interessante neste estudo foi o efeito do TFA sobre o crescimento do tumor. Observamos na S4 uma redução no crescimento do tumor, porém na S6 houve um aumento no crescimento tumoral. Recentemente Gomes e colaboradores (2021) estudaram o efeito do treinamento aeróbico na vasculatura tumoral em com câncer de mama, utilizando três linhagens diferentes de células tumorais, sendo uma

delas a linhagem E0771, a mesma utilizada neste estudo. Foi realizado o treinamento aeróbico diariamente com intensidade moderada a vigorosa em esteira de corrida por um tempo de 30 a 45 min. Os autores demonstraram que em sete dias de treinamento, foi observado um retardo no crescimento tumoral (GOMES-SANTOS; AMOOZGAR; KUMAR; HO *et al.*, 2021).

8. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

O presente estudo apresenta algumas limitações que merecem consideração para uma interpretação adequada dos resultados e para orientar futuras pesquisas.

A escolha de utilizar camundongos C57BL/6J fêmeas pode introduzir um viés, uma vez que estudos prévios sugerem um efeito cardioprotetor nessa linhagem. Essa característica pode mascarar ou modificar certos resultados, tornando necessário investigar os efeitos do tratamento em camundongos C57BL/6J machos para uma compreensão mais abrangente.

Embora tenhamos utilizado uma linhagem específica de células tumorais, os resultados podem não ser generalizáveis para outras linhagens ou tipos de câncer. Portanto, são necessários estudos adicionais que investiguem o efeito do tratamento com Doxo em diferentes linhagens celulares para uma compreensão mais completa do seu impacto no coração.

Existe incerteza sobre o momento ideal para iniciar o treinamento físico aeróbico (TFA) em relação ao tratamento com Doxo. Apesar de termos iniciado o TFA junto com o tratamento com Doxo, é importante explorar como diferentes momentos de início do exercício podem influenciar os resultados, considerando as peculiaridades biológicas e os potenciais efeitos sinérgicos ou adversos.

Além das mencionadas, outras limitações incluem a falta de análise de parâmetros cardiovasculares adicionais, potenciais efeitos adversos do TFA não investigados, como lesões musculares ou fadiga, e a possível interferência de fatores externos, como dieta ou ambiente. Para mitigar essas limitações, foram adotadas medidas rigorosas de controle experimental e análises complementares serão consideradas em estudos futuros

9. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo fornecem insights valiosos sobre os efeitos da doxorubicina (Doxo) na cardiotoxicidade e a eficácia do treinamento físico aeróbico (TFA) como uma intervenção preventiva ou mitigadora. Através de uma abordagem abrangente, demonstramos que o protocolo de indução da cardiotoxicidade foi eficaz na redução da fração de ejeção ventricular esquerda (FEVE), aumento da captação de ¹⁸F-FDG e produção de ROS e inflamação. Além disso, identificamos o aumento do SUV como um marcador precoce de cardiotoxicidade, destacando sua relevância clínica potencial.

Nossos resultados também revelam o TFA como uma estratégia promissora na proteção do coração contra os efeitos adversos da Doxo. Ao minimizar a redução da FEVE, melhorar o metabolismo miocárdico e controlar a produção de ROS e inflamação, o TFA emergiu como uma intervenção clinicamente significativa. No entanto, é importante reconhecer as limitações deste estudo, incluindo a utilização de uma única linhagem de células tumorais e a falta de investigação sobre o momento ideal para iniciar o TFA em relação ao tratamento com Doxo.

Portanto, este estudo destaca a necessidade contínua de pesquisas adicionais para aprimorar nossa compreensão dos mecanismos subjacentes à cardiotoxicidade da Doxo e avaliar a eficácia de intervenções como o TFA em diferentes cenários clínicos. Essa abordagem holística pode levar a avanços significativos no manejo da cardiotoxicidade em pacientes em tratamento oncológico, melhorando sua qualidade de vida e prognóstico.

REFERÊNCIAS

- AL-MALKY, H. S.; AL HARTHI, S. E.; OSMAN, A. M. Major obstacles to doxorubicin therapy: Cardiotoxicity and drug resistance. **J Oncol Pharm Pract**, 26, n. 2, p. 434-444, Mar 2020.
- ALAGARATNAM, T. T.; CHOI, T. K.; ONG, G. B. Doxorubicin and hyperpigmentation. **Aust N Z J Surg**, 52, n. 5, p. 531-533, Oct 1982.
- ALAM KHAN, S.; JAWAID AKHTAR, M. Structural modification and strategies for the enhanced doxorubicin drug delivery. **Bioorg Chem**, 120, p. 105599, Mar 2022.
- ALCANTARA, D.; LEAL, M. P.; GARCÍA-BOCANEGRA, I.; GARCÍA-MARTÍN, M. L. Molecular imaging of breast cancer: present and future directions. **Frontiers in chemistry**, 2, p. 112, 2014.
- ALTER, B. P.; GIRI, N.; SAVAGE, S. A.; PETERS, J. A. *et al.* Malignancies and survival patterns in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndromes cohort study. **British journal of haematology**, 150, n. 2, p. 179-188, 2010.
- ALTER, B. P.; GIRI, N.; SAVAGE, S. A.; PETERS, J. A. *et al.* Malignancies and survival patterns in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndromes cohort study. **Br J Haematol**, 150, n. 2, p. 179-188, Jul 2010.
- ANAND, U.; DEY, A.; CHANDEL, A. K. S.; SANYAL, R. *et al.* Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. **Genes Dis**, 10, n. 4, p. 1367-1401, Jul 2023.
- ARMSTRONG, G. T.; PLANA, J. C.; ZHANG, N.; SRIVASTAVA, D. *et al.* Screening adult survivors of childhood cancer for cardiomyopathy: comparison of echocardiography and cardiac magnetic resonance imaging. **J Clin Oncol**, 30, n. 23, p. 2876-2884, Aug 10 2012.
- ASSELIN, C. Y.; LAM, A.; CHEUNG, D. Y. C.; EEKHOUDT, C. R. *et al.* The Cardioprotective Role of Flaxseed in the Prevention of Doxorubicin- and Trastuzumab-Mediated Cardiotoxicity in C57BL/6 Mice. **J Nutr**, 150, n. 9, p. 2353-2363, Sep 1 2020.
- AUSONI, S.; AZZARELLO, G. Development of Cancer in Patients With Heart Failure: How Systemic Inflammation Can Lay the Groundwork. **Front Cardiovasc Med**, 7, p. 598384, 2020.
- BASU, S.; HESS, S.; NIELSEN BRAAD, P. E.; OLSEN, B. B. *et al.* The Basic Principles of FDG-PET/CT Imaging. **PET Clin**, 9, n. 4, p. 355-370, v, Oct 2014.
- BAUCKNEHT, M.; FERRARAZZO, G.; FIZ, F.; MORBELLI, S. *et al.* Doxorubicin Effect on Myocardial Metabolism as a Prerequisite for Subsequent Development of Cardiac Toxicity: A Translational (18)F-FDG PET/CT Observation. **J Nucl Med**, 58, n. 10, p. 1638-1645, Oct 2017.

BECKER, M. M. C.; ARRUDA, G. F. A.; BERENQUER, D. R. F.; BURIL, R. O. *et al.* Anthracycline cardiotoxicity: current methods of diagnosis and possible role of (18)F-FDG PET/CT as a new biomarker. **Cardiooncology**, 9, n. 1, p. 17, Mar 27 2023.

BERTRAM, J. S. The molecular biology of cancer. **Mol Aspects Med**, 21, n. 6, p. 167-223, Dec 2000.

BOELLAARD, R.; DELGADO-BOLTON, R.; OYEN, W. J.; GIAMMARILE, F. *et al.* FDG PET/CT: EANM procedure guidelines for tumour imaging: version 2.0. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, 42, n. 2, p. 328-354, Feb 2015.

BONETTO, A.; ANDERSSON, D. C.; WANING, D. L. Assessment of muscle mass and strength in mice. **Bonekey Rep**, 4, p. 732, 2015.

BURGUIN, A.; DIORIO, C.; DUROCHER, F. Breast Cancer Treatments: Updates and New Challenges. **J Pers Med**, 11, n. 8, Aug 19 2021.

CAMPOS, M.; FEITOSA, R. H. F.; MIZZACI, C. C.; FLACH, M. *et al.* The Benefits of Exercise in Breast Cancer. **Arq Bras Cardiol**, 119, n. 6, p. 981-990, Dec 2022.

CARDINALE, D.; COLOMBO, A.; LAMANTIA, G.; COLOMBO, N. *et al.* Anthracycline-induced cardiomyopathy: clinical relevance and response to pharmacologic therapy. **Journal of the American College of Cardiology**, 55, n. 3, p. 213-220, 2010.

CHEN, J. J.; WU, P.-T.; MIDDLEKAUFF, H. R.; NGUYEN, K.-L. Aerobic exercise in anthracycline-induced cardiotoxicity: a systematic review of current evidence and future directions. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, 312, n. 2, p. H213-H222, 2017.

CHEN, J. J.; WU, P. T.; MIDDLEKAUFF, H. R.; NGUYEN, K. L. Aerobic exercise in anthracycline-induced cardiotoxicity: a systematic review of current evidence and future directions. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 312, n. 2, p. H213-h222, Feb 1 2017.

CHEVIN, M.; CHABRIER, S.; DINOMAIS, M.; BEDELL, B. J. *et al.* Benefits of hypothermia in neonatal arterial ischemic strokes: A preclinical study. **Int J Dev Neurosci**, 80, n. 4, p. 257-266, Jun 2020.

CHOKSEY, A.; TIMM, K. N. Cancer Therapy-Induced Cardiotoxicity-A Metabolic Perspective on Pathogenesis, Diagnosis and Therapy. **Int J Mol Sci**, 23, n. 1, Dec 31 2021.

DA SILVA, J. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. **Rio de**, 2020.

DANTAS DE ARAÚJO SANTOS CAMARGO, J.; DOS SANTOS, J.; SIMÕES, T. C.; CARVALHO, J. B. L. *et al.* Mortality due to breast cancer in a region of high socioeconomic vulnerability in Brazil: Analysis of the effect of age-period and cohort. **PLoS One**, 16, n. 8, p. e0255935, 2021.

DE BOER, M. C.; WÖRNER, E. A.; VERLAAN, D.; VAN LEEUWEN, P. A. M. The Mechanisms and Effects of Physical Activity on Breast Cancer. **Clin Breast Cancer**, 17, n. 4, p. 272-278, Jul 2017.

DE BOER, R. A.; HULOT, J. S.; TOCCHETTI, C. G.; ABOUMSALLEM, J. P. *et al.* Common mechanistic pathways in cancer and heart failure. A scientific roadmap on behalf of the Translational Research Committee of the Heart Failure Association (HFA) of the European Society of Cardiology (ESC). **Eur J Heart Fail**, 22, n. 12, p. 2272-2289, Dec 2020.

DE ONCOLOGIA CLÍNICA, S. B.; DE MEDICINA, I. d. C. F.; KALIL FILHO, R.; HAJJAR, L. A. *et al.* I Brazilian guideline for cardio-oncology from Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, 96, n. 2 Suppl 1, p. 1-52, 2011.

DEMPKE, W. C. M.; ZIELINSKI, R.; WINKLER, C.; SILBERMAN, S. *et al.* Anthracycline-induced cardiotoxicity - are we about to clear this hurdle? **Eur J Cancer**, 185, p. 94-104, May 2023.

DESAI, V. G.; VIJAY, V.; LEE, T.; HAN, T. *et al.* MicroRNA-34a-5p as a promising early circulating preclinical biomarker of doxorubicin-induced chronic cardiotoxicity. **J Appl Toxicol**, 42, n. 9, p. 1477-1490, Sep 2022.

DOLINSKY, V. W.; ROGAN, K. J.; SUNG, M. M.; ZORDOKY, B. N. *et al.* Both aerobic exercise and resveratrol supplementation attenuate doxorubicin-induced cardiac injury in mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 305, n. 2, p. E243-253, Jul 15 2013.

DUCHARME, J.; GOERTZEN, A. L.; PATTERSON, J.; DEMETER, S. Practical aspects of 18F-FDG PET when receiving 18F-FDG from a distant supplier. **Journal of nuclear medicine technology**, 37, n. 3, p. 164-169, 2009.

ERIC, H.; SLOGGETT, C. E.; IWANOCHKO, R. M.; RAKOWSKI, H. *et al.* Feasibility and accuracy of left ventricular volumes and ejection fraction determination by fundamental, tissue harmonic, and intravenous contrast imaging in difficult-to-image patients. **Journal of the American Society of Echocardiography**, 13, n. 3, p. 216-224, 2000.

<estimativa-2023.pdf>.

EVANS, P. L.; MCMILLIN, S. L.; WEYRAUCH, L. A.; WITCZAK, C. A. Regulation of Skeletal Muscle Glucose Transport and Glucose Metabolism by Exercise Training. **Nutrients**, 11, n. 10, Oct 12 2019.

FABIANI, I.; AIMO, A.; GRIGORATOS, C.; CASTIGLIONE, V. *et al.* Oxidative stress and inflammation: determinants of anthracycline cardiotoxicity and possible therapeutic targets. **Heart Fail Rev**, 26, n. 4, p. 881-890, Jul 2021.

FENG, Y.; SPEZIA, M.; HUANG, S.; YUAN, C. *et al.* Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. **Genes Dis**, 5, n. 2, p. 77-106, Jun 2018.

FOULKES, S. J.; HOWDEN, E. J.; HAYKOWSKY, M. J.; ANTILL, Y. *et al.* Exercise for the Prevention of Anthracycline-Induced Functional Disability and Cardiac Dysfunction: The BREXIT Study. **Circulation**, 147, n. 7, p. 532-545, Feb 14 2023.

FRANKLIN, B. A.; EIJSVOGELS, T. M. H.; PANDEY, A.; QUINDRY, J. *et al.* Physical activity, cardiorespiratory fitness, and cardiovascular health: A clinical practice statement of the American Society for Preventive Cardiology Part II: Physical activity, cardiorespiratory fitness, minimum and goal intensities for exercise training, prescriptive methods, and special patient populations. **Am J Prev Cardiol**, 12, p. 100425, Dec 2022.

GABIZON, A.; SHMEEDA, H.; BARENHOLZ, Y. Pharmacokinetics of pegylated liposomal Doxorubicin: review of animal and human studies. **Clin Pharmacokinet**, 42, n. 5, p. 419-436, 2003.

GAYTAN, S. L.; LAWAN, A.; CHANG, J.; NURUNNABI, M. *et al.* The beneficial role of exercise in preventing doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Front Physiol**, 14, p. 1133423, 2023.

GHIGNATTI, P.; RUSSO, M. K. B.; BECKER, T.; GUECHEVA, T. N. *et al.* Preventive aerobic training preserves sympathovagal function and improves DNA repair capacity of peripheral blood mononuclear cells in rats with cardiomyopathy. **Sci Rep**, 12, n. 1, p. 6422, Apr 19 2022.

GINSBURG, O.; BRAY, F.; COLEMAN, M. P.; VANDERPUYE, V. *et al.* The global burden of women's cancers: a grand challenge in global health. **The Lancet**, 389, n. 10071, p. 847-860, 2017.

GIOVANNUCCI, E.; HARLAN, D. M.; ARCHER, M. C.; BERGENSTAL, R. M. *et al.* Diabetes and cancer: a consensus report. **Diabetes Care**, 33, n. 7, p. 1674-1685, Jul 2010.

GIZA, D. E.; ILIESCU, G.; HASSAN, S.; MARMAGKIOLIS, K. *et al.* Cancer as a Risk Factor for Cardiovascular Disease. **Curr Oncol Rep**, 19, n. 6, p. 39, Jun 2017.

GOMES-SANTOS, I. L.; AMOOZGAR, Z.; KUMAR, A. S.; HO, W. W. *et al.* Exercise Training Improves Tumor Control by Increasing CD8(+) T-cell Infiltration via CXCR3 Signaling and Sensitizes Breast Cancer to Immune Checkpoint Blockade. **Cancer Immunol Res**, 9, n. 7, p. 765-778, Jul 2021.

GOMES-SANTOS, I. L.; JORDAO, C. P.; PASSOS, C. S.; BRUM, P. C. *et al.* Exercise Training Preserves Myocardial Strain and Improves Exercise Tolerance in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. **Front Cardiovasc Med**, 8, p. 605993, 2021.

GOMES-SANTOS, I. L.; JORDÃO, C. P.; PASSOS, C. S.; BRUM, P. C. *et al.* Exercise Training Preserves Myocardial Strain and Improves Exercise Tolerance in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, 8, p. 200, 2021.

HAESEN, S.; JAGER, M. M.; BRILLOUET, A.; DE LAAT, I. *et al.* Pyridoxamine Limits Cardiac Dysfunction in a Rat Model of Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. **Antioxidants (Basel)**, 13, n. 1, Jan 17 2024.

HAJJAR, L. A.; COSTA, I.; LOPES, M.; HOFF, P. M. G. *et al.* Brazilian Cardio-oncology Guideline - 2020. **Arq Bras Cardiol**, 115, n. 5, p. 1006-1043, Nov 2020.

HENRIKSSON, H.; HENRIKSSON, P.; TYNELIUS, P.; EKSTEDT, M. *et al.* Cardiorespiratory fitness, muscular strength, and obesity in adolescence and later chronic disability due to cardiovascular disease: a cohort study of 1 million men. **Eur Heart J**, 41, n. 15, p. 1503-1510, Apr 14 2020.

HOWDEN, E. J.; BIGARAN, A.; BEAUDRY, R.; FRASER, S. *et al.* Exercise as a diagnostic and therapeutic tool for the prevention of cardiovascular dysfunction in breast cancer patients. **Eur J Prev Cardiol**, 26, n. 3, p. 305-315, Feb 2019.

JAIN, D.; ARONOW, W. Cardiotoxicity of cancer chemotherapy in clinical practice. **Hosp Pract (1995)**, 47, n. 1, p. 6-15, Feb 2019.

JAMAR, F.; BUSCOMBE, J.; CHITI, A.; CHRISTIAN, P. E. *et al.* EANM/SNMMI guideline for 18F-FDG use in inflammation and infection. **J Nucl Med**, 54, n. 4, p. 647-658, Apr 2013.

JIANG, X.; DU, Y.; MENG, X.; ZHANG, H. *et al.* Low-Dose Radiation Enhanced Inhibition of Breast Tumor Xenograft and Reduced Myocardial Injury Induced by Doxorubicin. **Dose Response**, 16, n. 4, p. 1559325818813061, Oct-Dec 2018.

JIA, X.; F, YU.; J, WANG.; S, IWANOWYCZ. *et al.* Emodin suppresses pulmonary metastasis of breast cancer accompanied with decreased macrophage recruitment and M2 polarization in the lungs. **Breast Cancer Res Treat.** 142 (2) 291-302, 2014

KARLSTAEDT, A.; MOSLEHI, J.; DE BOER, R. A. Cardio-onco-metabolism: metabolic remodelling in cardiovascular disease and cancer. **Nat Rev Cardiol**, 19, n. 6, p. 414-425, Jun 2022.

KHASRAW, M.; BELL, R.; DANG, C. Epirubicin: is it like doxorubicin in breast cancer? A clinical review. **Breast**, 21, n. 2, p. 142-149, Apr 2012.

KNUUTI, J.; SCHELBERT, H. R.; BAX, J. J. The need for standardisation of cardiac FDG PET imaging in the evaluation of myocardial viability in patients with chronic ischaemic left ventricular dysfunction. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, 29, n. 9, p. 1257-1266, Sep 2002.

KOEVOETS, E. W.; SCHAGEN, S. B.; DE RUITER, M. B.; GEERLINGS, M. I. *et al.* Effect of physical exercise on cognitive function after chemotherapy in patients with breast cancer: a randomized controlled trial (PAM study). **Breast Cancer Res**, 24, n. 1, p. 36, May 26 2022.

KOKKINOS, P.; FASELIS, C.; SAMUEL, I. B. H.; PITTARAS, A. *et al.* Cardiorespiratory Fitness and Mortality Risk Across the Spectra of Age, Race, and Sex. **J Am Coll Cardiol**, 80, n. 6, p. 598-609, Aug 9 2022.

KONG, C. Y.; GUO, Z.; SONG, P.; ZHANG, X. *et al.* Underlying the Mechanisms of Doxorubicin-Induced Acute Cardiotoxicity: Oxidative Stress and Cell Death. **Int J Biol Sci**, 18, n. 2, p. 760-770, 2022.

KOUZI, S. A.; UDDIN, M. N. Aerobic Exercise Training as a Potential Cardioprotective Strategy to Attenuate Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. **J Pharm Pharm Sci**, 19, n. 3, p. 399-410, Jul-Sep 2016.

LACERDA, D. R.; MORAES, M. M.; NUNES-SILVA, A.; COSTA, K. A. *et al.* Aerobic training reduces immune cell recruitment and cytokine levels in adipose tissue in obese mice. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, 44, n. 5, p. 512-520, 2019.

LE NAOUR, A.; ROSSARY, A.; VASSON, M. P. EO771, is it a well-characterized cell line for mouse mammary cancer model? Limit and uncertainty. **Cancer Med**, 9, n. 21, p. 8074-8085, Nov 2020.

LEI, P.; WANG, W.; SHELDON, M.; SUN, Y. *et al.* Role of Glucose Metabolic Reprogramming in Breast Cancer Progression and Drug Resistance. **Cancers (Basel)**, 15, n. 13, Jun 28 2023.

LI, D.; YANG, Y.; WANG, S.; HE, X. *et al.* Role of acetylation in doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Redox Biol**, 46, p. 102089, Oct 2021.

LI, K.; SUNG, R. Y.; HUANG, W. Z.; YANG, M. *et al.* Thrombopoietin protects against in vitro and in vivo cardiotoxicity induced by doxorubicin. **Circulation**, 113, n. 18, p. 2211-2220, May 9 2006.

LIU, J. E. Anthracycline-Induced Cardiotoxicity: Remembering the Forgotten Ventricle. **JACC CardioOncol**, 2, n. 1, p. 23-25, Mar 2020.

MACHAC, J.; BACHARACH, S. L.; BATEMAN, T. M.; BAX, J. J. *et al.* Positron emission tomography myocardial perfusion and glucose metabolism imaging. **J Nucl Cardiol**, 13, n. 6, p. e121-151, Nov 2006.

MARQUES-ALEIXO, I.; SANTOS-ALVES, E.; MARIANI, D.; RIZO-ROCA, D. *et al.* Physical exercise prior and during treatment reduces sub-chronic doxorubicin-induced mitochondrial toxicity and oxidative stress. **Mitochondrion**, 20, p. 22-33, Jan 2015.

MEIJERS, W. C.; DE BOER, R. A. Common risk factors for heart failure and cancer. **Cardiovasc Res**, 115, n. 5, p. 844-853, Apr 15 2019.

MENG, C.; FAN, L.; WANG, X.; WANG, Y. *et al.* Preparation and Evaluation of Animal Models of Cardiotoxicity in Antineoplastic Therapy. **Oxid Med Cell Longev**, 2022, p. 3820591, 2022.

MEYER, H. J.; WIENKE, A.; SUROV, A. Associations between GLUT expression and SUV values derived from FDG-PET in different tumors-A systematic review and meta analysis. **PLoS One**, 14, n. 6, p. e0217781, 2019.

MILLER, P. W.; LONG, N. J.; VILAR, R.; GEE, A. D. Synthesis of ¹¹C, ¹⁸F, ¹⁵O, and ¹³N radiolabels for positron emission tomography. **Angew Chem Int Ed Engl**, 47, n. 47, p. 8998-9033, 2008.

MOODY, J. B.; LEE, B. C.; CORBETT, J. R.; FICARO, E. P. *et al.* Precision and accuracy of clinical quantification of myocardial blood flow by dynamic PET: A technical perspective. **J Nucl Cardiol**, 22, n. 5, p. 935-951, Oct 2015.

NAHRENDORF, M.; FRANTZ, S.; SWIRSKI, F. K.; MULDER, W. J. *et al.* Imaging systemic inflammatory networks in ischemic heart disease. **J Am Coll Cardiol**, 65, n. 15, p. 1583-1591, Apr 21 2015.

NELSON, C. A.; WANG, J. Q.; LEAV, I.; CRANE, P. D. The interaction among glucose transport, hexokinase, and glucose-6-phosphatase with respect to ³H-2-deoxyglucose retention in murine tumor models. **Nucl Med Biol**, 23, n. 4, p. 533-541, May 1996.

NENSA, F.; KLOTH, J.; TEZGAH, E.; POEPEL, T. D. *et al.* Feasibility of FDG-PET in myocarditis: Comparison to CMR using integrated PET/MRI. **J Nucl Cardiol**, 25, n. 3, p. 785-794, Jun 2018.

OLIVEIRA, L. F.; O'CONNELL, J. L.; CARVALHO, E. E.; PULICI É, C. *et al.* Comparison between Radionuclide Ventriculography and Echocardiography for Quantification of Left Ventricular Systolic Function in Rats Exposed to Doxorubicin. **Arq Bras Cardiol**, 108, n. 1, p. 12-20, Jan 2017.

OLIVEIRA, L. F. L. d.; O'CONNELL, J. L.; CARVALHO, E. E. V. d.; PULICI, É. C. C. *et al.* Comparison between radionuclide ventriculography and echocardiography for quantification of left ventricular systolic function in rats exposed to doxorubicin. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, 108, p. 12-20, 2017.

OSIECKI, S.; STERLIŃSKI, M.; MARCINIAK-EMMONS, M.; DZIUK, M. Feasibility of (¹⁸)FDG PET in the cardiac inflammation. **Int J Cardiovasc Imaging**, 37, n. 3, p. 1097-1104, Mar 2021.

OU DOT, A.; COURTEAU, A.; GUILLEMIN, M.; VRIGNEAUD, J. M. *et al.* [(¹²³)I]MIBG is a better early marker of anthracycline cardiotoxicity than [(¹⁸)F]FDG: a preclinical SPECT/CT and simultaneous PET/MR study. **EJNMMI Res**, 11, n. 1, p. 92, Sep 20 2021.

PATNAIK, J. L.; BYERS, T.; DIGUISEPPI, C.; DABELEA, D. *et al.* Cardiovascular disease competes with breast cancer as the leading cause of death for older females diagnosed with breast cancer: a retrospective cohort study. **Breast Cancer Res**, 13, n. 3, p. R64, Jun 20 2011.

PATNAIK, J. L.; BYERS, T.; DIGUISEPPI, C.; DABELEA, D. *et al.* Cardiovascular disease competes with breast cancer as the leading cause of death for older females

diagnosed with breast cancer: a retrospective cohort study. **Breast Cancer Research**, 13, n. 3, p. 1-9, 2011.

PAYDARY, K.; SERAJ, S. M.; ZADEH, M. Z.; EMAMZADEHFARD, S. *et al.* The Evolving Role of FDG-PET/CT in the Diagnosis, Staging, and Treatment of Breast Cancer. **Mol Imaging Biol**, 21, n. 1, p. 1-10, Feb 2019.

PEEL, A. B.; BARLOW, C. E.; LEONARD, D.; DEFINA, L. F. *et al.* Cardiorespiratory fitness in survivors of cervical, endometrial, and ovarian cancers: The Cooper Center Longitudinal Study. **Gynecol Oncol**, 138, n. 2, p. 394-397, Aug 2015.

PEEL, A. B.; THOMAS, S. M.; DITTUS, K.; JONES, L. W. *et al.* Cardiorespiratory fitness in breast cancer patients: a call for normative values. **J Am Heart Assoc**, 3, n. 1, p. e000432, Jan 13 2014.

PETROSINO, J. M.; HEISS, V. J.; MAURYA, S. K.; KALYANASUNDARAM, A. *et al.* Graded Maximal Exercise Testing to Assess Mouse Cardio-Metabolic Phenotypes. **PLoS One**, 11, n. 2, p. e0148010, 2016.

RABELO, P. C.; CORDEIRO, L. M.; AQUINO, N. S.; FONSECA, B. B. *et al.* Rats with higher intrinsic exercise capacities exhibit greater preoptic dopamine levels and greater mechanical and thermoregulatory efficiencies while running. **Journal of Applied Physiology**, 126, n. 2, p. 393-402, 2019.

RAPSOMANIKI, E.; TIMMIS, A.; GEORGE, J.; PUJADES-RODRIGUEZ, M. *et al.* Blood pressure and incidence of twelve cardiovascular diseases: lifetime risks, healthy life-years lost, and age-specific associations in 1.25 million people. **Lancet**, 383, n. 9932, p. 1899-1911, May 31 2014.

REGEV, O.; KIZNER, M.; RONCATO, F.; DADIANI, M. *et al.* ICAM-1 on Breast Cancer Cells Suppresses Lung Metastasis but Is Dispensable for Tumor Growth and Killing by Cytotoxic T Cells. **Front Immunol**, 13, p. 849701, 2022.

<RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 30, DE 02 DE FEVEREIRO DE 2016..pdf>.

RISCHPLER, C.; DIRSCHINGER, R. J.; NEKOLLA, S. G.; KOSSMANN, H. *et al.* Prospective Evaluation of ¹⁸F-Fluorodeoxyglucose Uptake in Postischemic Myocardium by Simultaneous Positron Emission Tomography/Magnetic Resonance Imaging as a Prognostic Marker of Functional Outcome. **Circ Cardiovasc Imaging**, 9, n. 4, p. e004316, Apr 2016.

ROCK, C. L.; THOMSON, C. A.; SULLIVAN, K. R.; HOWE, C. L. *et al.* American Cancer Society nutrition and physical activity guideline for cancer survivors. **CA Cancer J Clin**, 72, n. 3, p. 230-262, May 2022.

RODRIGUES, D.; COYLE, L.; FÜZI, B.; FERREIRA, S. *et al.* Unravelling Mechanisms of Doxorubicin-Induced Toxicity in 3D Human Intestinal Organoids. **Int J Mol Sci**, 23, n. 3, Jan 24 2022.

ROSENTHAL, N.; BROWN, S. The mouse ascending: perspectives for human-disease models. **Nat Cell Biol**, 9, n. 9, p. 993-999, Sep 2007.

ROSS, R.; BLAIR, S. N.; ARENA, R.; CHURCH, T. S. *et al.* Importance of Assessing Cardiorespiratory Fitness in Clinical Practice: A Case for Fitness as a Clinical Vital Sign: A Scientific Statement From the American Heart Association. **Circulation**, 134, n. 24, p. e653-e699, Dec 13 2016.

ROSSI NETO, J. M.; CASADEI, C.; FINGER, M. A. Insuficiência Cardíaca Aguda. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, 30, n. 2, p. 47-57, 2020.

ROTH, G. A.; MENSAH, G. A.; JOHNSON, C. O.; ADDOLORATO, G. *et al.* Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. **J Am Coll Cardiol**, 76, n. 25, p. 2982-3021, Dec 22 2020.

ROY, S.; WHITEHEAD, T. D.; LI, S.; ADEMUYIWA, F. O. *et al.* Co-clinical FDG-PET radiomic signature in predicting response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, 49, n. 2, p. 550-562, Jan 2022.

SALVATICI, M.; CARDINALE, D.; SPAGGIARI, L.; VEGLIA, F. *et al.* Atrial fibrillation after thoracic surgery for lung cancer: use of a single cut-off value of N-terminal pro-B type natriuretic peptide to identify patients at risk. **Biomarkers**, 15, n. 3, p. 259-265, 2010.

SANTOS, M. d. O.; LIMA, F. C. d. S. d.; MARTINS, L. F. L.; OLIVEIRA, J. F. P. *et al.* Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 69, n. 1, 2023.

SANTOS-ALVES, E.; RIZO-ROCA, D.; MARQUES-ALEIXO, I.; COXITO, P. *et al.* Physical exercise positively modulates DOX-induced hepatic oxidative stress, mitochondrial dysfunction and quality control signaling. **Mitochondrion**, 47, p. 103-113, Jul 2019.

SARASWAT, N.; SOOD, A.; VERMA, R.; KUMAR, D. *et al.* Nail Changes Induced by Chemotherapeutic Agents. **Indian J Dermatol**, 65, n. 3, p. 193-198, May-Jun 2020.

SAROCCHI, M.; BAUCKNEHT, M.; ARBOSCELLO, E.; CAPITANIO, S. *et al.* An increase in myocardial 18-fluorodeoxyglucose uptake is associated with left ventricular ejection fraction decline in Hodgkin lymphoma patients treated with anthracycline. **J Transl Med**, 16, n. 1, p. 295, Oct 25 2018.

SCHELBERT, H. R.; PHELPS, M. E.; HUANG, S. C.; MACDONALD, N. S. *et al.* N-13 ammonia as an indicator of myocardial blood flow. **Circulation**, 63, n. 6, p. 1259-1272, Jun 1981.

SCHWAIGER, M.; KALFF, V.; ROSENSPIRE, K.; HAKA, M. S. *et al.* Noninvasive evaluation of sympathetic nervous system in human heart by positron emission tomography. **Circulation**, 82, n. 2, p. 457-464, Aug 1990.

SCHWARTSBURD, P. Cancer-Induced Reprogramming of Host Glucose Metabolism: "Vicious Cycle" Supporting Cancer Progression. **Front Oncol**, 9, p. 218, 2019.

SCHWARTZ, R. G.; JAIN, D.; STOROZYNSKY, E. Traditional and novel methods to assess and prevent chemotherapy-related cardiac dysfunction noninvasively. **Journal of Nuclear Cardiology**, 20, n. 3, p. 443-464, 2013.

SESTIER, M.; HILLIS, C.; FRASER, G.; LEONG, D. Bruton's tyrosine kinase Inhibitors and Cardiotoxicity: More Than Just Atrial Fibrillation. **Curr Oncol Rep**, 23, n. 10, p. 113, Aug 3 2021.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; WAGLE, N. S.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2023. **CA Cancer J Clin**, 73, n. 1, p. 17-48, Jan 2023.

SMUDER, A. J.; KAVAZIS, A. N.; MIN, K.; POWERS, S. K. Exercise protects against doxorubicin-induced oxidative stress and proteolysis in skeletal muscle. **J Appl Physiol (1985)**, 110, n. 4, p. 935-942, Apr 2011.

SOBCZUK, P.; CZERWIŃSKA, M.; KLEIBERT, M.; CUDNOCH-JĘDRZEJEWSKA, A. Anthracycline-induced cardiotoxicity and renin-angiotensin-aldosterone system-from molecular mechanisms to therapeutic applications. **Heart Fail Rev**, 27, n. 1, p. 295-319, Jan 2022.

SONGBO, M.; LANG, H.; XINYONG, C.; BIN, X. *et al.* Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Toxicol Lett**, 307, p. 41-48, Jun 1 2019.

STURGEON, K.; SCHADLER, K.; MUTHUKUMARAN, G.; DING, D. *et al.* Concomitant low-dose doxorubicin treatment and exercise. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 307, n. 6, p. R685-R692, 2014.

STURGEON, K. M.; KY, B.; LIBONATI, J. R.; SCHMITZ, K. H. The effects of exercise on cardiovascular outcomes before, during, and after treatment for breast cancer. **Breast cancer research and treatment**, 143, n. 2, p. 219-226, 2014.

STURGEON, K. M.; KY, B.; LIBONATI, J. R.; SCHMITZ, K. H. The effects of exercise on cardiovascular outcomes before, during, and after treatment for breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, 143, n. 2, p. 219-226, Jan 2014.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA Cancer J Clin**, 71, n. 3, p. 209-249, May 2021.

SZABLEWSKI, L. Expression of glucose transporters in cancers. **Biochim Biophys Acta**, 1835, n. 2, p. 164-169, Apr 2013.

TAEGETMEYER, H.; YOUNG, M. E.; LOPASCHUK, G. D.; ABEL, E. D. *et al.* Assessing Cardiac Metabolism: A Scientific Statement From the American Heart Association. **Circ Res**, 118, n. 10, p. 1659-1701, May 13 2016.

TEIXEIRA-COELHO, F.; FONSECA, C. G.; BARBOSA, N. H. S.; VAZ, F. F. *et al.* Effects of manipulating the duration and intensity of aerobic training sessions on the physical performance of rats. **PLoS One**, 12, n. 8, p. e0183763, 2017.

THACKERAY, J. T.; PIETZSCH, S.; STAPEL, B.; RICKE-HOCH, M. *et al.* Insulin supplementation attenuates cancer-induced cardiomyopathy and slows tumor disease progression. **JCI Insight**, 2, n. 10, May 18 2017.

TILLISCH, J.; BRUNKEN, R.; MARSHALL, R.; SCHWAIGER, M. *et al.* Reversibility of cardiac wall-motion abnormalities predicted by positron tomography. **N Engl J Med**, 314, n. 14, p. 884-888, Apr 3 1986.

TOCCHETTI, C. G.; AMERI, P.; DE BOER, R. A.; D'ALESSANDRA, Y. *et al.* Cardiac dysfunction in cancer patients: beyond direct cardiomyocyte damage of anticancer drugs: novel cardio-oncology insights from the joint 2019 meeting of the ESC Working Groups of Myocardial Function and Cellular Biology of the Heart. **Cardiovasc Res**, 116, n. 11, p. 1820-1834, Sep 1 2020.

TRANCHITA, E.; MURRI, A.; GRAZIOLI, E.; CERULLI, C. *et al.* The Beneficial Role of Physical Exercise on Anthracyclines Induced Cardiotoxicity in Breast Cancer Patients. **Cancers (Basel)**, 14, n. 9, May 3 2022.

UREN, N. G.; MELIN, J. A.; DE BRUYNE, B.; WIJNS, W. *et al.* Relation between myocardial blood flow and the severity of coronary-artery stenosis. **N Engl J Med**, 330, n. 25, p. 1782-1788, Jun 23 1994.

VAN DER SCHOOT, G. G. F.; ORMEL, H. L.; WESTERINK, N. L.; MAY, A. M. *et al.* Optimal Timing of a Physical Exercise Intervention to Improve Cardiorespiratory Fitness: During or After Chemotherapy. **JACC CardioOncol**, 4, n. 4, p. 491-503, Nov 2022.

VAQUERO, J. J.; KINAHAN, P. Positron Emission Tomography: Current Challenges and Opportunities for Technological Advances in Clinical and Preclinical Imaging Systems. **Annu Rev Biomed Eng**, 17, p. 385-414, 2015.

WERNER, R. A.; CHEN, X.; ROWE, S. P.; LAPA, C. *et al.* Recent paradigm shifts in molecular cardiac imaging—Establishing precision cardiology through novel (18)F-labeled PET radiotracers. **Trends Cardiovasc Med**, 30, n. 1, p. 11-19, Jan 2020.

WERNER, R. A.; CHEN, X.; ROWE, S. P.; LAPA, C. *et al.* Recent paradigm shifts in molecular cardiac imaging—Establishing precision cardiology through novel 18F-labeled PET radiotracers. **Trends in Cardiovascular Medicine**, 30, n. 1, p. 11-19, 2020.

WIESTAD, T. H.; RAASTAD, T.; NORDIN, K.; IGELSTROM, H. *et al.* The Phys-Can observational study: adjuvant chemotherapy is associated with a reduction whereas physical activity level before start of treatment is associated with maintenance of maximal oxygen uptake in patients with cancer. **BMC Sports Sci Med Rehabil**, 12, p. 53, 2020.

WU, B. B.; LEUNG, K. T.; POON, E. N. Mitochondrial-Targeted Therapy for Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. **Int J Mol Sci**, 23, n. 3, Feb 9 2022.

WU, G.; ZHANG, X.; GAO, F. The epigenetic landscape of exercise in cardiac health and disease. **J Sport Health Sci**, 10, n. 6, p. 648-659, Dec 2021.

YAMADA, T.; UCHIDA, M.; KWANG-LEE, K.; KITAMURA, N. *et al.* Correlation of metabolism/hypoxia markers and fluorodeoxyglucose uptake in oral squamous cell carcinomas. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, 113, n. 4, p. 464-471, Apr 2012.

YANG, F.; TEVES, S. S.; KEMP, C. J.; HENIKOFF, S. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. **Biochim Biophys Acta**, 1845, n. 1, p. 84-89, Jan 2014.

YANG, H. L.; HSIEH, P. L.; HUNG, C. H.; CHENG, H. C. *et al.* Early Moderate Intensity Aerobic Exercise Intervention Prevents Doxorubicin-Caused Cardiac Dysfunction Through Inhibition of Cardiac Fibrosis and Inflammation. **Cancers (Basel)**, 12, n. 5, Apr 28 2020.

YOOD, M. U.; WELLS, K. E.; ALFORD, S. H.; DAKKI, H. *et al.* Cardiovascular outcomes in women with advanced breast cancer exposed to chemotherapy. **Pharmacoepidemiology and drug safety**, 21, n. 8, p. 818-827, 2012.

YU, E. H.; SLOGGETT, C. E.; IWANOCHKO, R. M.; RAKOWSKI, H. *et al.* Feasibility and accuracy of left ventricular volumes and ejection fraction determination by fundamental, tissue harmonic, and intravenous contrast imaging in difficult-to-image patients. **J Am Soc Echocardiogr**, 13, n. 3, p. 216-224, Mar 2000.

ZAMORANO, J. L.; LANCELLOTTI, P.; RODRIGUEZ MUNOZ, D.; ABOYANS, V. *et al.* 2016 ESC Position Paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of the ESC Committee for Practice Guidelines: The Task Force for cancer treatments and cardiovascular toxicity of the European Society of Cardiology (ESC). **European heart journal**, 37, n. 36, p. 2768-2801, 2016.

ZHANG, H.; XU, A.; SUN, X.; YANG, Y. *et al.* Self-Maintenance of Cardiac Resident Reparative Macrophages Attenuates Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy Through the SR-A1-c-Myc Axis. **Circ Res**, 127, n. 5, p. 610-627, Aug 14 2020.

ZHANG, Y.; LI, Q.; HUANG, Z.; LI, B. *et al.* Targeting Glucose Metabolism Enzymes in Cancer Treatment: Current and Emerging Strategies. **Cancers (Basel)**, 14, n. 19, Sep 21 2022.

ANEXO A – Comissão de ética no uso de animais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Uso de radiofármacos PET para o estudo dos mecanismos associados a cardiotoxicidade decorrente da quimioterapia e do consequente efeito cardioprotetor do exercício aeróbico em modelo murino de câncer de mama", protocolo do CEUA: 51/2022 sob a responsabilidade de Luciano Fonseca Lemos de Oliveira que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 25/04/2022.

Vigência da Autorização	25/04/2022 a 24/04/2027
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6J
Nº de animais	6
Peso/Idade	25g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6J
Nº de animais	8
Peso/Idade	25g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6J
Nº de animais	10
Peso/Idade	25g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6J
Nº de animais	10
Peso/Idade	25g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6J
Nº de animais	10
Peso/Idade	25g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6J
Nº de animais	10

Peso/Idade	25g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6J
Nº de animais	10
Peso/Idade	25g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6J
Nº de animais	8
Peso/Idade	25g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6J
Nº de animais	10
Peso/Idade	25g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6J
Nº de animais	10
Peso/Idade	25g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6J
Nº de animais	10
Peso/Idade	25g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6J
Nº de animais	10
Peso/Idade	25g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6J
Nº de animais	5
Peso/Idade	25g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6J
Nº de animais	5
Peso/Idade	25g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
Dados dos animais agrupados (uso do biotério)	
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6J
Nº de animais	122

Idade	2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG

Considerações posteriores:

08/05/2023	Pedido de Adendo Aprovado com Recomendação na reunião ordinária on-line do dia 08/05/2023. Pedido de adendo para inclusão de 5 grupos experimentais, totalizando 40 animais. Recomendação: Para a realização dos projetos de pesquisa, o pesquisador deve seguir estritamente a metodologia aprovada pela CEUA, incluindo o número de animais aprovados em cada grupo experimental. A equipe deve passar por treinamento previamente à execução dos procedimentos experimentais. Caso o grupo não tenha experiência e seja necessário padronizar o modelo utilizado, deve haver previsão de grupos experimentais para essa finalidade. Se houver qualquer ocorrência que possa comprometer a execução ou a conclusão do protocolo, deve-se comunicar estes fatos previamente à CEUA para evitar a utilização desnecessária de animais.
25/04/2022	Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 25/04/2022. Validade: 25/04/2022 à 24/04/2027.

Belo Horizonte, 08/05/2023.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

APÊNDICES A – Minicurrículo

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Mariana Duarte de Souza

Contato: maridsouza20@gmail.com

Lattes ID: <http://lattes.cnpq.br/8180883138546982>

FORMAÇÃO ACADÊMICA/ TITULAÇÃO

2021–2024: Mestrado em andamento em Ciências da Reabilitação na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Título: Treinamento físico aeróbico promove efeito cardioprotetor sobre a cardiotoxicidade induzida por doxorubicina em modelo murino de câncer de mama.

Orientador: Luciano Fonseca Lemos de Oliveira.

Coorientadora: Brígida Gomes de Almeida Schirmer.

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

2022–2023: Especialização em Fisioterapia Cardiovascular pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR). Carga Horária: 375 horas.

2022-2023: Especialização em Fisiologia clínica do exercício pela Universidade Federal de São Carlos (UFScar). Carga Horária: 360 horas.

2015-2019: Bacharelado em Fisioterapia pelo Centro Universitário de Viçosa – Univiçosa.

Título: Análise da pele de camundongos submetidos a radiação Ultravioleta do tipo (UVA E UVB). Orientadora: Michelle Barbosa Soares

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Cursos

2023 - Radioproteção para o Preparo, Uso e Manuseio de Fontes Radioativas. Carga horária: 40 horas. Instituição: Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear, CDTN.

2023 - Radiação na Saúde – Aplicação em Medicina Nuclear. Carga horária: 30 horas. Instituição: Universidade Estadual Paulista – Campus de Botucatu – Faculdade de Medicina.

2023 - Preparação e Resposta a Emergências Radiológicas. Carga horária: 8 horas. Instituição: Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear, CDTN.

2023 - Capacitação em Escrita Científica. Carga horária: 15 horas. Instituição Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional EEEFTO – UFMG.

2023 - Ética na Escrita Científica e Apresentação de Resultados. Carga horária: 30 horas. Instituição: Universidade Federal de São Carlos. UFScar.

2022- Capacitação do Uso e Manejo de Animais de Laboratório. Carga horária: 60 horas. Instituição: Instituto de Ciências Biológicas de USP, ICB/USP.

2022- Cuidados Paliativos e Tanatologia. Carga horária:15 horas. Instituição Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional EEEFTO – UFMG.

2022- Introdução a Proteção Radiológica. Carga Horaria: 3 horas. Instituição: Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear, CDTN.

PROJETOS DE PESQUISA

2021 – Atual: Uso de radiofármacos PET para o estudo dos mecanismos associados a cardiotoxicidade decorrente da quimioterapia e do consequente efeito cardioprotetor do exercício aeróbico em modelo murino de câncer de mama.

Orientador: Luciano Fonseca Lemos de Oliveira.

Coorientadora: Brígida Gomes de Almeida Schirmer.

PROJETOS DE EXTENSÃO

2021- Atual: Reabilitação cardiopulmonar da criança e do adolescente. Coordenadores: Prof^a. Dr^a. Fernanda de Cordoba Lanza e Prof. Dr. Luciano Fonseca Lemos de Oliveira. Carga horária semanal: 8 horas. Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

2021: Fisioterapeuta na Unidade de terapia Intensiva e enfermaria do Hospital São João Batista em viçosa – MG.

2023- 2024: Fisioterapeuta na Unidade de Terapia Intensiva Pediátrico da Santa Casa BH em Belo Horizonte – MG – Atual.

2023: Preceptora de estágio em cardiorrespiratório na instituição Centro Universitário Newton Paiva – Vaga Temporária.

COORIENTAÇÃO DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

2023-2024 Discente: Ianara Pereira Silva

Título: Efeito cardioprotetor do exercício sobre a cardiotoxicidade em modelo murino de câncer de mama

Orientador: Luciano Fonseca Lemos de Oliveira

Coorientadoras: Danielle A. Gomes Pereira e Mariana Duarte de Souza

BANCA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

1. Título: Diabetes: Fatores de Riscos Cardiovasculares associados

Nome do Candidato: Bruna de Jesus Tropoli

Instituição: Centro Universitário de Viçosa – Univiçosa

Data: 24 de maio de 2023

2. Título: Prevalência de fatores de Riscos Cardiovasculares em uma Instituição de Ensino

Nome do Candidato: Vitória de Queiroz Messias

Instituição: Centro Universitário de Viçosa – Univiçosa

Data: 24 de maio de 2023

3. Título: Relação entre índice de massa corporal e indicadores de obesidade abdominal em jovens obesos

Nome do Candidato: Gael Machado Ferreira

Instituição: Centro Universitário de Viçosa – Univiçosa

Data: 25 de maio de 2023

AULA MINISTRADA COMO CONVIDADA

1. Tema: Suporte Básico de Vida em adultos (prática)

Convidada pela Prof^a.Isabel Cristina Sousa

Instituição: Centro Universitário de Viçosa – Univiçosa

Data: 25 de maio de 2023

COLABORAÇÃO EM PROJETOS DE PESQUISA

1. Título do projeto: Avaliação da Eficácia do radiofármaco PET/ [18F] DPA- 714 para o estudo da neuroinflamação em modelo murino.

Pesquisador responsável: Brígida Gomes de Almeida Schirmer

2. Título do projeto: Investigação das alterações cardíacas em camundongos infectados com o Betacoronavírus MHV-3, um vírus like SARS – COV2.

Pesquisador responsável: Natália Muradas Valério Souza

PREMIAÇÕES

2022: 1º Place in the Best Scientific Initiation - Poster category. Is a non-invasive method for ECG and HRV assessment capable to detect ventricular dysfunction and sympathetic denervation? OLIVEIRA, R.D.B.; TANAKA, D.M.; DAMASCENO, T.R.; FABRÍCIO, C.G.; RESENDE, A.A.; CARVALHO, E.E.V.; GONÇALVES, D.A.P.; MAGNANI, E.F.; **SOUZA, M.D.**; SIMÕES, M.V.; OLIVEIRA, L.F.L. 77th Brazilian Congress of Cardiology and 2022 World Congress of Cardiology.

PRODUÇÕES

Artigo completo publicado em periódicos

Sousa BLSC, Dos Santos Rosa T, Silvino VO, Barros EML, de Luca Corrêa H, do Prado DML, Veras-Silva AS, **de Souza MD**, de Lima CEB, de Oliveira LFL, Dos Santos MAP. Physical and autonomic functionality in women with breast cancer pre and post chemotherapy: a case control study. BMC Sports Sci Med Rehabil. 2024 Jan 2;16(1):5. doi: 10.1186/s13102-023-00797-y. PMID: 38167062; PMCID: PMC10763182.

Apresentações de trabalho e Resumos publicados em anais de congressos

1. DAMASCENO, T. R.; MAGNANI, E. F.; OLIVEIRA, R. D. B.; PEREIRA, J. M.; TANAKA, D. M.; **SOUZA, M. D.**; CABEZA, J. M.; FABRÍCIO, C. G.; RESENDE, A. A.; GONCALVES, D. A. P.; SIMOES, M. V.; OLIVEIRA, L. F. L. Association of myocardial changes with functional capacity and effects of aerobic physical training in syrian hamsters with chronic Chagas cardiomyopathy. 2022.

2. OLIVEIRA, R. D. B.; TANAKA, D. M.; DAMASCENO, T. R.; FABRICIO, C. G.; RESENDE, A. A.; CARVALHO, E. E. V.; GONCALVES, D. A. P.; MAGNANI, E. F.; **SOUZA, M. D.**; SIMOES, M. V.; OLIVEIRA, L. F. L. Is a non-invasive method for ECG and HRV assessment capable to detect ventricular dysfunction and sympathetic denervation?. 2022
3. SOUZA, N.M.V.; ALVES, I.V.; ALVES, A.R.P.; MELO, T.L.; LACERDA, L.S.B.; **SOUZA, M.D.**; SCHIRMER, B.G.A.; OLIVEIRA, R.D.B.; MALAMUT, C.; OLIVEIRA, L.F.L.; RESENDE, C.R.; COSTA, V.V.; TEIXEIRA, M.M.; LEMOS, V.S. Investigação das alterações cardíacas em camundongos infectados com o Betacoronavírus MHV-3, um vírus like SARS – COV2. PITCHOF SCIENCE 2023.

EVENTOS

1. 77th Brazilian Congress of Cardiology and 2022 World Congress of Cardiology. 2022. (Congresso).
2. I Simpósio SMC-DERC-SBC- Ergometria Reabilitação Cardiovascular Medicina Nuclear e Cardiologia do Esporte. 2022. (Simpósio).
3. I Jornada Mineira de Atualização em Fisioterapia Cardiorrespiratória e em Terapia Intensiva. 2022. (Jornada)
4. XX Simpósio Internacional de Fisioterapia Cardiorrespiratória e Fisioterapia em Terapia Intensiva (XX SIFR 2022). (Simpósio)
5. XXVI Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular. 2022. (Simpósio).