

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO
ADULTO

RODRIGO MENDONÇA CARDOSO PESTANA

**AVALIAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS, MARCADORES HEMOSTÁTICOS E
CARDIOVASCULARES EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA SUBMETIDAS
À QUIMIOTERAPIA POR DOXORRUBICINA**

Belo Horizonte

2022

RODRIGO MENDONÇA CARDOSO PESTANA

**AVALIAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS, MARCADORES HEMOSTÁTICOS E
CARDIOVASCULARES EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA SUBMETIDAS
À QUIMIOTERAPIA POR DOXORRUBICINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto.

Orientadora: Profa. Dra. Karina Braga Gomes Borges

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Simões

Belo Horizonte

2022

P476a

Pestana, Rodrigo Mendonça Cardoso.

Avaliação de Micropartículas, Marcadores Hemostáticos e Cardiovasculares em pacientes com Câncer de Mama submetidas à Quimioterapia por Doxorrubicina [recursos eletrônicos]. / Rodrigo Mendonça Cardoso Pestana. - - Belo Horizonte: 2022.

162f.: il.

Formato: PDF.

Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Karina Braga Gomes Borges.

Coorientador (a): Ricardo Simões.

Área de concentração: Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto.

Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Neoplasias da Mama. 2. Doxorrubicina. 3. Cardiotoxicidade. 4. Hemostasia. 5. Micropartículas Derivadas de Células. 6. Biomarcadores Tumoraes. 7. Dissertação Acadêmica. I. Borges, Karina Braga Gomes. II. Simões, Ricardo. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WP 870

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO

FOLHA DE APROVAÇÃO

AValiação de micropartículas, marcadores hemostáticos e cardiovasculares em pacientes com câncer de mama submetidas à quimioterapia por doxorubicina

RODRIGO MENDONÇA CARDOSO PESTANA

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia treze de dezembro de dois mil e vinte e dois, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores doutores:

Karina Braga Gomes Borges - Orientadora
UFMG

Ricardo Simões - Coorientador
FCMMG

Daniel Dias Ribeiro
HC-UFMG

Luci Maria Sant'Ana Dusse
UFMG

Fernanda Freire Campos Nunes
UnIBH

Marcus Vinícius Bolívar Malachias
FCMMG

Belo Horizonte, 13 de dezembro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Simões**, **Usuário Externo**, em 14/12/2022, às 16:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luci Maria Sant Ana Dusse**, **Professora Magistério Superior - Voluntária**, em 14/12/2022, às 16:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Karina Braga Gomes Borges**, **Professora do Magistério Superior**, em 14/12/2022, às 20:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Dias Ribeiro**, **Médico**, em 17/12/2022, às 11:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcus Vinícius Bolívar Malachias**, **Usuário Externo**, em 02/01/2023, às 17:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Freire Campos Nunes**, **Usuária Externa**, em 20/01/2023, às 12:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1947861** e o código CRC **2DCD6252**.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitora

Profa. Sandra Regina Goulart Almeida

Vice-Reitor

Prof. Alessandro Fernandes Moreira

Pró-Reitor de Pós-Graduação

Profa. Isabela Almeida Pordeus

Pró-Reitor de Pesquisa

Prof. Fernando Marcos dos Reis

Faculdade de Medicina

Diretora

Profa. Alamanda Kfoury Pereira

Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto

Coordenadora

Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Sub-Coordenadora

Profa. Luciana Costa Faria

Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto

Profa. Claudia Alves Couto

Profa. Gilda Aparecida Ferreira

Profa. Karina Braga Gomes Borges

Profa. Luciana Costa Faria

Profa. Luciana Diniz Silva

Profa. Melissa Orlandin Premaor

Fábia Carolina Pereira Resende

DEDICATÓRIA

À todas as vítimas, fatais ou não, sobretudo aquelas mulheres com câncer de mama e vítimas direta ou indiretamente, da pandemia de Covid-19.

A todos que perderam algum ente querido para o Sars-Cov2 e para a própria ignorância humana.

A todos os profissionais de saúde, que não cessam de lutar.

Aos cientistas, que não desistem de tentar levar alguma luz à humanidade.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à minha orientadora, Karina Braga, por sua amizade, apoio, suporte e exemplo. Acredite, que essa Tese é muito menor perto do que aprendi com você como ser humano, como professora e como pesquisadora. A simples oportunidade de conviver com você nesses 7 e poucos anos é o meu maior título alcançado.

Estendo esse agradecimento ao meu co-orientador, prof. Dr. Ricardo Simões. Agradeço a oportunidade em dar continuidade ao seu trabalho, em poder estender seus objetivos. Agradeço por confiar em mim parte dos seus esforços.

Agradeço aos meus pais pelo incentivo, apoio e exemplo de professores que são.

Agradeço aos meus amigos, que seguraram as minhas mãos. Que acolheram e consolaram, me distraíram, me apoiaram. Dos quais posso destacar Mariana, Mara, LÍlian, Maria Augusta, Nelson.

Agradeço ao Hospital João XXIII, que foi como minha segunda casa. Me ensinou muito do profissional que sou hoje. Obrigado por me ensinar o SUS em que acredito. Obrigado por ter me dado amigos e colegas maravilhosos. Obrigado por essa experiência profissional surreal.

Pelas maternais acolhidas, agradeço à cidade de Belo Horizonte, à Universidade Federal de Minas Gerais (especialmente à Faculdade de Farmácia e Faculdade de Medicina). Agradeço pelas colaborações dos colegas do LINBIO (Laboratório Institucional de Pesquisa em Biomarcadores), especialmente à profa. Dra. Maria das Graças Carvalho, prof. Dr. Adriano de Paula Sabino, Dra Rita Carolina Duarte Figueiredo, Dra Michelle Teodoro Alves e toda a equipe técnica.

Às instituições parceiras desse estudo, FIOCRUZ-Minas (Instituto René Rachou), especialmente a Dra Andréa Teixeira de Carvalho e equipe técnica da Plataforma de Citometria de Fluxo. À Funed (Fundação Ezequiel Dias), especialmente Dra Heloísa H. M. Oliveira e Dra. Luciana M. Silva. Ao Hospital Alberto Cavalcanti (FHEMIG). À CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro em diversas ocasiões.

“O amor é eterno, a sua manifestação pode modificar-se, mas nunca a sua essência... Através do amor vemos as coisas com mais tranquilidade, e somente com essa tranquilidade um trabalho pode ser bem-sucedido.”

Vincent van Gogh

RESUMO

O câncer de mama é o câncer mais prevalente em mulheres e ocupa o segundo lugar entre as causas de morte por câncer em mulheres. A doxorubicina (DOXO) é uma antraciclina utilizada no tratamento do câncer de mama e embora tenha um impacto significativo na redução da mortalidade por câncer de mama, possui efeitos adversos que podem comprometer o tratamento e diminuir a qualidade de vida das pacientes, sendo mais comum a cardiotoxicidade. O objetivo central desse trabalho é a avaliação de marcadores hemostáticos (como o teste de geração de trombina), cardiovasculares e micropartículas em pacientes com câncer de mama em tratamento com DOXO, com ou sem cardiotoxicidade secundária ao tratamento. No delineamento central do estudo, foram incluídas 80 pacientes com diagnóstico de carcinoma de mama com indicação de quimioterapia com DOXO como primeira escolha. As pacientes foram acompanhadas prospectivamente em três tempos, antes da quimioterapia (T0), depois da quimioterapia (T1) e 12 meses após a quimioterapia (T2). A média de idade das participantes foi de $50,3 \pm 12,7$ anos. A dose mediana de DOXO administrada foi de 380 mg/m^2 e a cardiotoxicidade teve frequência de 33,75%, sendo observados 7 óbitos. O tipo histológico prevalente foi o carcinoma ductal invasivo (90%). No estudo prospectivo, pacientes com cardiotoxicidade tiveram maior pico de trombina (em T0) e uma maior contagem micropartículas totais (T0), micropartículas derivadas de cardiomiócitos (T0 e T1), de endotélio (T0 e T1) e que expressam fator tissular (T0). Em uma abordagem secundária (estudo caso-controle), níveis séricos de GDF-15 foram maiores em pacientes com câncer de mama em comparação com indivíduos saudáveis. Os dados sugerem que o tratamento com DOXO pode alterar os parâmetros hemostáticos, função cardíaca, marcadores cardiovasculares e induzir a liberação de micropartículas em pacientes que a utilizam no tratamento quimioterápico de câncer de mama.

Palavras-chave:

câncer de mama, doxorubicina, cardiotoxicidade, hemostasia, micropartículas, marcadores

ABSTRACT

Breast cancer is the most prevalent cancer in women and is the second leading cause of cancer death in women. Doxorubicin (DOXO) is an anthracycline used in breast cancer treatment. It has adverse effects that can implicate treatment and decrease the life quality of patients. The most common adverse effect is cardiotoxicity. The main aim of this study is the evaluation of hemostatic biomarkers (like thrombin generation test), cardiovascular biomarkers and microparticles in breast cancer patients under DOXO chemotherapy, with or not cardiotoxicity secondary to anti-cancer treatment. The leading study design included 80 women with breast carcinoma and with indication for DOXO chemotherapy. The patients were followed prospectively at three times, before chemotherapy (T0), after chemotherapy (T1) and 12 months after chemotherapy (T2). The mean age was 50.3 ± 12.7 years. The median dose of DOXO administered was 380 mg/m² and the rate of cardiotoxicity was 33.75%, 7 deaths had occurred. The prevalent histological type was invasive ductal carcinoma (90%). In the prospective study, patients with cardiotoxicity had a higher thrombin peak (at T0), higher count of total microparticles (T0), microparticles derived from cardiomyocytes (T0 and T1), microparticles derived from endothelium (T0 and T1) and microparticles that express tissue factor (T0). In a secondary approach (case-control study), serum levels of GDF-15 were higher in breast cancer patients compared to healthy subjects. The data suggest that DOXO treatment can change hemostatic parameters, cardiac function, cardiovascular markers and induce the release of microparticles in patients who use it in the chemotherapy treatment of breast cancer.

Keywords:

breast cancer, doxorubicin, cardiotoxicity, hemostasis, microparticles, biomarkers

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DA DOXO (A) E DAUNORRUBICINA (B).....	26
FIGURA 2 - MECANISMO DE LESÃO CELULAR MEDIADA POR ANTRACICLINAS E MORTE CELULAR EM CÉLULAS TUMORAIS E CARDIOMIÓCITOS	28
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS MECANISMOS DE FORMAÇÃO DAS MPs, EXOSSOMOS E CORPOS APOPTÓTICOS.....	43
FIGURA 4 - TROMBOGRAMA TÍPICO COM PARÂMETROS RELEVANTES OBTIDOS PELO TESTE DE GERAÇÃO DE TROMBINA PELO MÉTODO CAT.	53
FIGURA 5 – ESQUEMA DA REAÇÃO DE FORMAÇÃO DE TROMBINA E CLIVAGEM DO SUBSTRATO FLUORESCENTE.	84
FIGURA 6 - TITULAÇÃO DE ANTI-ANEXIA V-EFLUOR 450.....	138
FIGURA 7 - TITULAÇÃO DOS ANTICORPOS PARA ANÁLISE DE PMPs, FTMPs, EMPs E CMPs.	139

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - CLASSIFICAÇÃO E DEFINIÇÃO DA CARDIOTOXICIDADE EM PACIENTES SOB TRATAMENTO DE CÂNCER DE ACORDO COM OS PROTOCOLOS DO ROYAL BROMPTON HOSPITAL (LONDRES, REINO UNIDO).....	32
QUADRO 2 - MONITORAMENTO DA CARDIOTOXICIDADE EM PACIENTES COM CÂNCER EM TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO.	34
QUADRO 3 - PARÂMETROS GERADOS NO TESTE DE GERAÇÃO DE TROMBINA (MÉTODO CAT)	54
QUADRO 4 - SIGNIFICADO E INTERPRETAÇÃO DOS PARÂMETROS GERADOS PELO TGT.	55
QUADRO 5 - EXAMES LABORATORIAIS: MÉTODOS ANALÍTICOS E VALORES DE REFERÊNCIA.	78
QUADRO 6 - ESCORE COMPASS-CAT PARA PREDIÇÃO DE TEV EM PACIENTES AMBULATORIAIS COM CÂNCER DE PULMÃO, MAMA, COLORRETAL OU OVARIANO, EM TERAPIA ANTICÂNCER.....	80
QUADRO 7 - PAINEL DEFINIDO PARA ANÁLISE MULTIPARAMÉTRICA DE MICROPARTÍCULAS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	85
QUADRO 8 - CONCENTRAÇÕES DE MARCADORES BIOQUÍMICOS DE AMOSTRAS CONTROLES UTILIZADOS NA PADRONIZAÇÃO PARA EXPERIMENTO DE MICROPARTÍCULAS DERIVADAS DE CARDIOMIÓCITOS.	136
QUADRO 9 - TÍTULOS DE ANTICORPOS/FLUOROCROMOS TESTADOS NA PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO DE MPs.....	136

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANP	peptídeo natriurético tipo A
APC	proteína C ativada
ATP	adenosina de tri-fosfato
AUC	área sob a curva
BNP	peptídeo natriurético tipo B
BRA	bloqueadores dos receptores da angiotensina-2
BRCA1	<i>breast cancer gene 1</i>
BRCA2	<i>breast cancer gene 2</i>
CAT	trombografia calibrada automatizada
CDH1	<i>E-caderin gene</i>
CK-MB	creatinofofoquinase fração MB
CMPs	micropartículas derivadas de cardiomiócitos
CPK-total	creatinofofoquinase
cTnI	troponina I
DCV	doenças cardiovasculares
DNA	ácido desoxirribonucléico
DOXO	doxorubicina
DVE	disfunção ventricular esquerda
EBCTCG	<i>Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group</i>
ECA	enzima conversora da angiotensina
ECG QTc	intervalo QT corrigido, derivado do ECG
ECG	eletrocardiograma
EGRF	receptor do fator de crescimento epidérmico
EMPs	micropartículas derivadas de endotélio
EPCR	receptor da proteína C da célula endotelial
ER	receptor de estrogênio
ESCRT	<i>endosomal sorting complex required for transport</i>
ETP	potencial endógeno de trombina
FABP3	proteína de ligação a ácido graxo-3
FABP4	proteína de ligação a ácido graxo-4

FABPs	proteínas de ligação a ácidos graxos
FEVE	fração de ejeção do ventrículo esquerdo
FHEMIG	Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FT	fator tissular
FTMPs	micropartículas que expressam fator tissular
gal-3	galectina 3
GDF-15	Growth/differentiation factor 15
GLS	<i>global longitudinal strain</i> (tensão longitudinal global)
HAC	Hospital Alberto Cavalcanti
HER2	fator de crescimento epidérmico tipo 2
HFpEF	insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada
HIF-2 α	fator 2 α indutível por hipóxia
HRP	peroxidase
hsPCR	proteína C-reativa, ensaio de alta sensibilidade
hsTnI	troponina I, ensaio de ultrasensibilidade
IC	insuficiência cardíaca
ICAM-1	molécula de adesão intercelular-1
ICC	insuficiência cardíaca congestiva
IECA	inibidores da enzima conversora de angiotensina
IMC	índice de massa corporal
INCA	Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva
IRR	Instituto René Rachou
LIGHT	<i>tumor necrosis factor superfamily member 14/TNFS14</i>
LIIM	Laboratório de Interdisciplinar de Investigação Médica
LINBIO	Laboratório Institucional de Pesquisa em Biomarcadores
LVSD	disfunção sistólica ventricular esquerda
miRNA	micro-RNA
MPO	mieloperoxidase
MPs	micropartículas
MPs	micropartículas
mRNA	RNA mensageiro
NT-próBNP	porção N-terminal do peptídeo natriurético tipo B
OMS	Organização Mundial de Saúde

PCR	proteína C reativa
PECAM-1	molécula de adesão celular endotelial-plaquetária tipo 1
PIGF	fator de crescimento placentário
PMPs	micropartículas derivadas de plaquetas
PPP	plasma pobre em plaquetas
PR	receptor de progesterona
PS	fosfatidilserina
PTEN	<i>phosphatase and tensin homologue gene</i>
RNA	ácido ribonucléico
RNS	espécies reativas de nitrogênio
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
ROS	espécies reativas de oxigênio
SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia
sCD14	forma solúvel de CD14
SES/MG	Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais
sFlt-1	tirosina quinase-1 solúvel do tipo Fms
STK11	<i>serine/threonine kinase 11 gene</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEV	tromboembolismo venoso
TFPI	inibidor da via do fator tissular
TGF1- β	fator de crescimento transformante beta tipo 1
TGF- β	fator-beta de transformação do crescimento
TGT	Teste de Geração de Trombina
TLR4	receptor <i>toll-like</i> tipo 4
TNF- α	fator de necrose tumoral- α
Top 2 α	topoisomerase 2 α
Top 2 β	topoisomerase-2 β ;
TP	tempo de pró-trombina
TP53	gene supressor de tumor (gene da proteína p53)
TSG101	<i>tumor susceptibility gene 101</i>
TTPa	tempo de tromboplastina parcial ativada
TVP	trombose venosa profunda

ucMGP	<i>uncarboxylated Matrix Gla-Protein</i>
uPA	ativador do plasminogênio tipo uroquinase
uPAR	receptor do ativador do plasminogênio tipo uroquinase
VCAM-1	molécula de adesão vascular-1
VE	ventrículo esquerdo
VEGF	fator de crescimento vascular endotelial
VEs	vesículas extracelulares
vWF	Fator de von Willebrand

SUMÁRIO

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS	18
1.2 ANTECEDENTES CIENTÍFICOS	22
1.2.1 CÂNCER DE MAMA	22
1.2.2 TRATAMENTO	25
1.2.2.1 DOXORRUBICINA	25
1.2.2.2 CARDIOTOXICIDADE	29
1.2.2.3 NOVOS BIOMARCADORES CARDIOVASCULARES.....	36
1.2.3 HEMOSTASIA E CÂNCER DE MAMA	39
1.2.4 VESÍCULAS EXTRACELULARES	41
1.2.4.1 FATOR TISSULAR	44
1.2.4.2 PLAQUETAS	46
1.2.4.3 ENDOTÉLIO	47
1.2.4.4 CARDIOMIÓCITOS.....	49
1.2.5 GERAÇÃO DE TROMBINA.....	50
1.2.6 RELAÇÃO INFLAMAÇÃO E HEMOSTASIA.....	55
1.6 TROMBOMODULINA	57
1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
2. OBJETIVOS	73
2.1 OBJETIVO GERAL.....	73
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	73
3. MATERIAIS E MÉTODOS	74
3.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	74
3.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO	74
3.3 TAMANHO AMOSTRAL	74
3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	75
3.5 CRITÉRIOS DE NÃO-INCLUSÃO	75
3.6 COLETA DE DADOS	75
3.6.1 MEDIÇÃO DA FEVE	76
3.6.2 ELETROCARDIOGRAMA (ECG)	76
3.6.3 COLETA DE SANGUE	77
3.6.4 EXAMES LABORATORIAIS	78
3.7 DEFINIÇÃO DE CARDIOTOXICIDADE	78
3.8 ESCORE DE RISCO PARA TEV	79
3.9 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	81
3.9.1 DETERMINAÇÃO DO NT-PRÓBNP.....	81
3.9.2 DETERMINAÇÃO DE TROMBOMODULINA PLASMÁTICA.....	81
3.9.3 DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS PLASMÁTICAS	81
3.9.4 DETERMINAÇÃO DOS NOVOS BIOMARCADORES CARDIOVASCULARES	82
3.9.5 ENSAIO DE TGT	82
3.9.6 ANÁLISE DE MICROPARTÍCULAS POR CITOMETRIA DE FLUXO	84
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	86
4. ARTIGO 1.....	87
ARTIGO PUBLICADO NA <i>THROMBOSIS RESEARCH</i>	87
5. ARTIGO 2.....	91
ARTIGO PUBLICADO NA <i>BLOOD COAGULATION & FIBRINOLYSIS</i>	91
6. ARTIGO 3.....	95
ARTIGO SUBMETIDO NOS ARQUIVOS BRASILEIROS DE CARDIOLOGIA	95
7. ARTIGO 4.....	122

MANUSCRITO PREPARADO PARA SUBMISSÃO NO JOURNAL OF MOLECULAR AND CELLULAR CARDIOLOGY	122
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	133
APÊNDICE I	135
1. VALIDAÇÃO DE ANTICORPO PARA DETERMINAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DERIVADAS DE CARDIOMIÓCITOS	135
2. TITULAÇÃO DE ANTICORPOS.....	136
ANEXO I.....	140
Aprovação do COEP/UFGM.....	140
ANEXO II.....	141
Aprovação do CEP/FHEMIG	141
ANEXO III.....	144
Artigo publicado em co-autoria na <i>Cardiovascular Toxicology</i>	144
ANEXO IV.....	144
Artigo publicado em co-autoria na <i>Immunological Investigations</i>	145
ANEXO V.....	146
Resumo publicado em <i>Anais de Evento Internacional: ISTH 2020</i>	146
ANEXO VI.....	147
Resumo publicado em <i>Anais de Evento Internacional: ISTH 2021</i>	147
ANEXO VII.....	148
Apresentação oral de trabalho em Congresso Internacional: <i>24th World Congress on Advances in Oncology and 24th International Symposium on Molecular Medicine</i>	148
ANEXO VIII.....	149
Apresentação oral de trabalho em Congresso Nacional: <i>47º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas</i> ...	149
ANEXO IX.....	150
Apresentação oral de trabalho em Congresso Nacional: <i>47º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas</i> ...	150
ANEXO X.....	151
Orientações de trabalhos de conclusão de curso (TCC) de graduação	151
ANEXO XI.....	156
Participações em bancas de trabalhos de conclusão de curso (TCC) de graduação	156
ANEXO XII.....	158
Aprovação em Processo Seletivo Simplificado para Professor Substituto	158
ANEXO XIII.....	159
Experiências como professor do magistério superior (substituto).....	159
ANEXO XIV.....	161
Comprovante de submissão artigo na <i>Arquivos Brasileiros de Cardiologia</i> : ‘ <i>New cardiovascular biomarkers in breast cancer patients undergoing doxorubicin-based chemotherapy</i> ’.....	161
ANEXO XV.....	162
Comprovante de submissão artigo no <i>Journal of Molecular and Cellular Cardiology</i> : <i>Microparticles and cardiotoxicity secondary to doxorubicin-based chemotherapy in breast cancer patients</i>	162

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O diagnóstico de cardiotoxicidade, pelo uso de antraciclinas, vem evoluindo com o passar dos anos, incorporando novos marcadores, como a troponina I (cTnI) e a porção N-terminal do peptídeo natriurético tipo B (NT-próBNP) e outras tecnologias, com o objetivo iniciar mais precocemente o seu tratamento e assim reduzir o impacto negativo da quimioterapia, subsidiando então intervenções clínicas mais eficazes.

Ainda não há estudos que avaliem o papel das micropartículas (MPs) nesse contexto, sobretudo as micropartículas derivadas de cardiomiócitos (CMPs), visto que a maioria são estudos *in vitro* ou *in vivo* com modelo animal, e a busca por novos biomarcadores preditores da cardiotoxicidade tem sido objetivo de muitos estudos.

Além disso, o comportamento hemostático de pacientes que são submetidos ao tratamento com doxorubicina (DOXO) é ainda avaliado com os testes tradicionais de coagulação, como o tempo de pró-trombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), contudo, a avaliação global da hemostasia, que é possível por meio do Teste de Geração de Trombina (TGT), ainda não é rotineiramente utilizada na prática clínica. Mesmo que a profilaxia antitrombótica não seja majoritariamente indicada nesse contexto, faz-se necessário o monitoramento deste estado de hipercoagulabilidade a fim de otimizar o tratamento quimioterápico e reduzir a morbimortalidade pelos seus efeitos adversos.

1.1 Introdução

O câncer de mama é a doença maligna mais comum em mulheres em todo o mundo. Uma em cada oito ou dez mulheres terão câncer de mama durante a vida (HARBECK; GNANT, 2017). É mais frequentemente diagnosticado na faixa etária entre os 55 e 64 anos, mas há uma ocorrência de até 5% em mulheres com menos de 40 anos. Como na maioria das doenças neoplásicas, o risco para o câncer de mama aumenta com a idade (ROJAS; STUCKEY, 2016).

Sua incidência tem aumentado substancialmente, a qual varia de 27/100.000 na Ásia Central e África, a 85-94/100.000 na Austrália, América do Norte e Europa Ocidental (SANCHO-GARNIER; COLONNA, 2019). A incidência estimada para o ano de 2022 nos Estados Unidos é de 287.850 casos e 43.250 óbitos (SIEGEL *et al.*, 2022). Segundo a estimativa oficial brasileira mais atualizada, publicada pelo Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA), estimam-se 66.280 casos novos de câncer de mama, para cada ano do triênio 2020-2022. Esse valor corresponde a um risco estimado de 61,61 casos novos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2019).

As complicações do tratamento do câncer são muitas vezes irreversíveis, entre elas, as complicações cardiovasculares. Dessa forma, a abordagem cardio-oncológica deve ser incluída na rotina dos pacientes. Observa-se que as doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de mortalidade em mulheres idosas que sobreviveram ao câncer de mama (PATNAIK *et al.*, 2011). Há de se enfatizar ainda, que as DCV e o câncer representam, respectivamente, a primeira e a segunda causa de morte nos países industrializados (CAPPETTA *et al.*, 2017; MEHTA *et al.*, 2018).

A cardiotoxicidade secundária ao tratamento do câncer pode ser precoce ou tardia, pode variar desde a disfunção ventricular esquerda (DVE) à insuficiência cardíaca (IC). Pode ser ainda reversível ou irreversível. A presença de arritmia supraventricular, DVE e alterações eletrocardiográficas, que surgem logo após a infusão da antraciclina caracteriza a toxicidade aguda, e pode acometer até 1% dos pacientes, sendo em geral reversível (HAJJAR, LUDHMILA

ABRAHÃ\POUNDSO *et al.*, 2020). A toxicidade pode manifestar-se ainda com hipertensão, arritmias, isquemia do miocárdio, doença valvar, doença tromboembólica, hipertensão pulmonar e pericardite. Porém, o efeito colateral mais comum e relatado, e por isso, o mais monitorado, é a DVE (ZAMORANO *et al.*, 2016).

As antraciclinas constituem um grupo de antineoplásicos reconhecidamente eficazes no tratamento de linfomas, leucemias, sarcomas e câncer de mama (HAJJAR, LUDHMILA ABRAHÃ\POUNDSO *et al.*, 2020). As antraciclinas, inicialmente isoladas na década de 1950 a partir de bactérias do gênero *Streptomyces*. A DOXO foi isolada de uma cepa mutante de *S. peucetius*, e foi considerada um dos agentes citotóxicos com maior atividade no câncer de mama metastático, contudo apresenta uma toxicidade dose-cumulativa, o que exige um rigoroso monitoramento (ANAMPA; MAKOWER; SPARANO, 2015).

Pacientes com câncer podem apresentar vários tipos de desordens hemostáticas que contribuem significativamente para a morbimortalidade. Há uma estreita relação entre doenças malignas, ocorrência de anormalidades na coagulação sanguínea e a trombose. Essa relação baseia-se no fato de que há mudança para um perfil pró-trombótico em pacientes com câncer, ao passo que a ativação da coagulação sanguínea estimula o crescimento e disseminação de tumores (FALANGA, ANNA *et al.*, 2017).

O estado hipercoagulável do câncer é multifatorial e certos agentes quimioterápicos, ou combinações deles, contribuem para isso (MUKHERJEE *et al.*, 2010; RICKLES; FALANGA, 2001; SWYSTUN *et al.*, 2009). O risco de tromboembolismo venoso (TEV) é maior em indivíduos com câncer de mama do que na população em geral (AHARON *et al.*, 2017; REBOUCAS *et al.*, 2013). O TEV é uma complicação que compromete o prognóstico de mulheres em quimioterapia. Ao estabelecer até que ponto um evento de TEV influencia o prognóstico, especialmente a longo prazo, é possível estabelecer um melhor manejo dessas complicações e otimização da terapia anti-câncer (KHAN *et al.*, 2017).

Dessa forma, esse estudo objetivou avaliar o estado hemostático de pacientes com câncer de mama em terapia com DOXO, por meio do TGT e sua relação com a cardiotoxicidade. Ainda nesse contexto, avaliou-se alguns novos biomarcadores cardiovasculares e inflamatórios e ainda as MPs derivadas de cardiomiócitos (CMPs), endotélio (EMPs), plaquetas e que expressam fator tissular (FTMPs), com o objetivo de estabelecer a relação com a cardiotoxicidade, contribuindo para elucidação da sua fisiopatologia.

1.2 Antecedentes científicos

1.2.1 Câncer de mama

O câncer de mama possui alta heterogeneidade em função da sua etiologia e características patológicas, uma vez que alguns casos possuem crescimento lento com excelente prognóstico, enquanto outros casos seguem um curso clínico altamente agressivo. Constitui-se um grande problema de saúde pública mundial por ser o câncer mais frequente em mulheres (SIEGEL *et al.*, 2022; TAO *et al.*, 2015).

A incidência do câncer de mama feminino superou a do câncer de pulmão, com uma estimativa de 2,3 milhões de novos casos (11,7%), seguido por câncer de pulmão (11,4%), colorretal (10,0%), de próstata (7,3%) e de estômago (5,6%). O câncer de pulmão continuou sendo a principal causa de morte por câncer, com uma estimativa de 1,8 milhão de mortes (18%), seguido por câncer colorretal (9,4%), fígado (8,3%), estômago (7,7%) e câncer de mama feminino (6,9%). Além de ser o tipo de câncer mais prevalente entre as mulheres, é também o que possui maior mortalidade nessa população (SUNG *et al.*, 2021).

A mortalidade do câncer de mama na América do Norte e União Europeia tem diminuído, o que se deve principalmente à detecção precoce e às terapias sistêmicas eficientes. Ainda assim, continua sendo a principal causa de morte por câncer em países menos desenvolvidos, e a segunda (após o câncer de pulmão) em países desenvolvidos. Na América do Sul, África e Ásia, observa-se um aumento na incidência do câncer de mama, muito provavelmente devido às mudanças nos hábitos e estilos de vidas e ao acesso aos programas de triagem. Observa-se ainda uma significativa mortalidade nessas regiões, o que pode ser parcialmente explicada pela lacuna entre o diagnóstico e o tratamento (HARBECK; GNANT, 2017).

De acordo com o INCA, a estimativa no Brasil para cada ano do triênio 2020-2022 aponta que ocorrerão 625 mil casos novos de câncer (450 mil, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma), sendo o câncer de pele não melanoma o mais incidente. Ainda de acordo com os dados do INCA (2019), estimam-se no Brasil 66.280 casos novos de câncer de mama, para cada ano do triênio 2020-2022. Esse valor corresponde a uma estimativa de 61,61 casos

novos a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não-melanoma, o câncer de mama em mulheres é o mais incidente em todas as regiões brasileiras. Em 2017, foram registrados 16.724 óbitos por câncer de mama feminino (INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CâNCER JOSÉ DE ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019)

Além da idade e sexo, uma variedade de fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama tem sido estabelecida. Dentre eles estão incluídos fatores não modificáveis, como a raça, características genéticas (variantes genéticas em oncogenes e genes supressores de tumor) e reprodutivas (exposição à hormônios endógenos – progesterona e estrógenos, menarca precoce, menopausa tardia) e histórico familiar. Bem como aqueles modificáveis relacionadas à dieta, uso de hormônios exógenos e sedentarismo. Os níveis circulantes de hormônios esteroides sexuais endógenos, como o estradiol, têm sido associados ao aumento do risco de câncer de mama entre mulheres na pós-menopausa (COUGHLIN, 2019; ŁUKASIEWICZ *et al.*, 2021).

Cerca de 15 a 20% do câncer de mama é familiar, referindo-se a mulheres afetadas que têm um ou mais parentes de primeiro ou segundo grau com a doença. O componente herdável (variantes genéticas) nessas famílias é significativo, especialmente em agregados familiares que possuem câncer de mama de início precoce. Desde a descoberta, nos anos 90, dos genes *BRCA1* e *BRCA2* de susceptibilidade autossômica dominante de alta penetrância, outros genes de alto risco foram identificados, como *TP53*, *STK11*, *CDH1* e *PTEN*. A presença de alguma dessas mutações representa aproximadamente 20% de risco para o desenvolvimento do câncer de mama familiar (ŁUKASIEWICZ *et al.*, 2021; WENDT; MARGOLIN, 2019).

A triagem de mulheres saudáveis objetiva a detecção de tumores menores, com menor chance de metástase, mais propensos à conservação da mama, à cirurgia axilar limitada e com menor probabilidade de necessitar de quimioterapia. Esse cenário se traduz em redução da morbidade relacionada ao tratamento e melhora na sobrevida da paciente (MCDONALD *et al.*, 2016).

O tecido mamário é composto por lóbulos (tecido glandular envolvido na produção de leite), ductos (conectam os lóbulos ao mamilo), tecido conjuntivo, tecido adiposo e tecido linfático. O câncer de mama ocorre quando há um crescimento desregulado de células dentro de qualquer componente da mama. Embora significativamente menos comum, o câncer de mama também pode ocorrer entre os homens. Seja *in situ* ou invasivo, a investigação, além do exame clínico das mamas, envolve exames de imagem, como mamografia, ultrassonografia ou ressonância magnética (WINTERS *et al.*, 2017).

Como parte do processo de diagnóstico, é realizada uma biópsia do tecido mamário ou de uma amostra de ressecção do tumor. Procede-se então o diagnóstico e estabelece-se o prognóstico com base no tipo histológico, classificação e estágio do tumor, usando os critérios definidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (LAL, S. *et al.*, 2017).

O tipo mais comum de tumor é o carcinoma invasivo sem tipo especial (anteriormente chamado de carcinoma ductal invasivo), sendo responsável por 80% de todos os casos. Os demais são classificados como tipos histológicos "especiais", pois exibem padrões únicos de crescimento. O carcinoma lobular invasivo é o tipo especial mais comum, representando entre 5% e 15% dos casos. Outros tipos especiais incluem os subtipos medular, metaplásico, tubular e mucinoso, todos com padrões de crescimento distintos e prognósticos variáveis (LAL, S. *et al.*, 2017; WAKS; WINER, 2019).

A classificação molecular é importante para o diagnóstico, prognóstico e planejamento do tratamento. Destacam-se como classificadores a presença do receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR) e o fator de crescimento epidérmico tipo 2 (*Human Epidermal growth factor Receptor-type 2* - HER2) (DAI *et al.*, 2016; RAKHA; REIS-FILHO; ELLIS, 2010). Pacientes com fenótipo positivo para receptores hormonais, como ER+ e/ou PR+, podem se beneficiar de uma terapia endócrina hormonal, enquanto aqueles que apresentam uma superexpressão de HER2 se beneficiam de uma terapia HER2-direcionada (ANAMPA; MAKOWER; SPARANO, 2015; JASRA; ANAMPA, 2018).

1.2.2 Tratamento

Os desfechos do câncer continuam melhorando devido à detecção mais precoce e às terapias direcionadas mais modernas. No entanto, a quimioterapia citotóxica, como as antraciclinas, ainda constituem uma das principais alternativas de tratamento, em especial para pacientes que não têm acesso aos imunoterápicos mais recentes, em função do alto custo, por isso os estudos com essas drogas continuam relevantes (MCGOWAN *et al.*, 2017).

A maioria das mulheres com câncer de mama em estágio inicial recebe terapias sistêmicas adjuvantes. A quimioterapia, a terapia hormonal e as terapias tecido-direcionadas (ou tecido-específicas) aumentam a efetividade da terapia local definitiva (tratamento cirúrgico, radioterapia ou ambos), diminuindo substancialmente a recorrência do câncer e consequentemente o óbito, embora ainda seja um desafio determinar quem se beneficiaria de tais tratamentos e quem provavelmente apresentaria os efeitos adversos. Assim, com o aumento dos custos dos cuidados em saúde e a introdução de terapias direcionadas, há uma contínua busca por biomarcadores periféricos que possam contribuir para o diagnóstico precoce, bem como pode determinar o prognóstico, prever a resposta à terapia, monitoramento da doença durante e pós-tratamento, e ainda os efeitos colaterais e toxicidade secundária (DUFFY; O'DONOVAN; CROWN, 2011; MAUGHAN; LUTTERBIE; HAM, 2010).

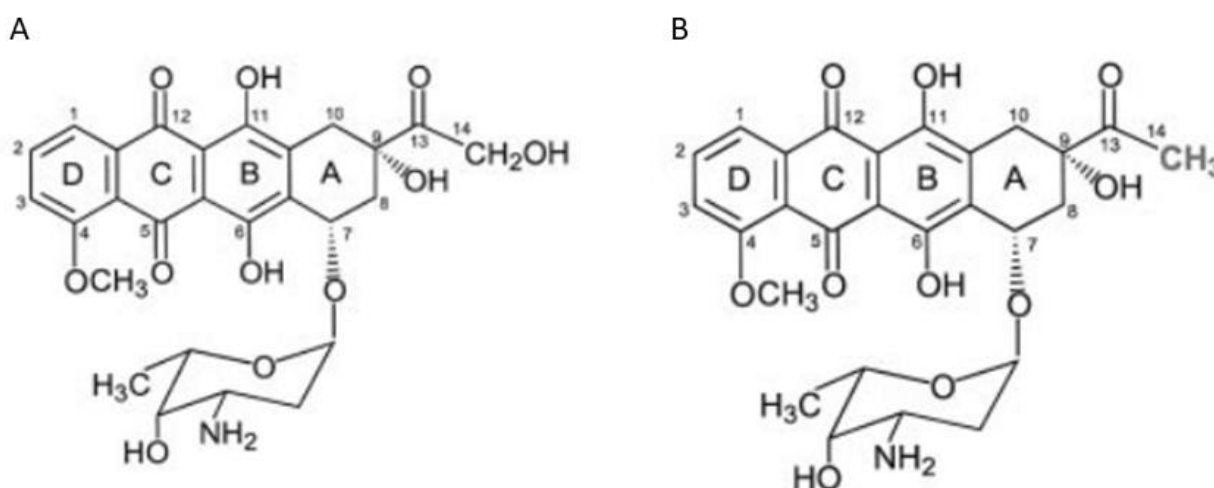
1.2.2.1 Doxorrubicina

De acordo com o *Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group* (EBCTCG) o uso integrado de antraciclinas e taxanos em esquemas de quimioterapia adjuvante produzem ganhos adicionais de sobrevida em pacientes com câncer de mama (EBCTCG: EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP, 2012). Esta associação também como neoadjuvante, é o regime mais amplamente usado para todos os subtipos de câncer de mama em estágio inicial e está associado às altas taxas de resposta clínica favorável (até 90%). Em pacientes com câncer de mama HER2+, o trastuzumabe (com ou sem pertuzumabe) deve ser administrado concomitantemente ao taxano (CAIN *et al.*, 2017).

As antraciclinas estão listadas pela OMS como medicamentos essenciais e estão entre os medicamentos anticâncer mais eficazes já desenvolvidas. Mesmo após 50 anos de sua descoberta, os efeitos antitumorais, assim como os seus mecanismos cardiotoxicos, continuam a despertar considerável interesse na pesquisa básica e de ensaios clínicos (MCGOWAN *et al.*, 2017).

Sua descoberta foi um marco nas técnicas de superprodução de medicamentos. As primeiras antraciclinas, a DOXO e seu precursor daunorrubicina, foram isoladas a partir de *S. peucetius*. Ambas são estruturalmente semelhantes - enquanto a cadeia lateral da DOXO termina com um álcool primário, na daunorrubicina é terminada com um grupo metila. Essa mínima diferença é responsável por consequências importantes no espectro de ação dessas drogas. A DOXO é essencial no tratamento do câncer de mama, tumores sólidos na infância, sarcomas, linfomas, mielomas, neuroblastomas, câncer de ovário, pâncreas, estômago, fígado e pulmão, enquanto a daunorrubicina possui atividade no tratamento das leucemias linfoblásticas ou mieloblásticas agudas (MCGOWAN *et al.*, 2017; MINOTTI *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2017). Na **Figura 1** estão representadas as estruturas químicas da DOXO e daunorrubicina.

Figura 1 – Estruturas químicas da DOXO (A) e daunorrubicina (B).



Fonte: MINOTTI *et al.*, 2004.

Em sua forma inalterada, a DOXO é uma antraciclina não seletiva de classe I, que possui uma fração aglicônica e uma glicídica. A aglicona é composta por um anel tetracíclico com grupos quinino-hidroquinona adjacentes, cadeia lateral

curta do substituinte metoxi, seguida pelo grupo carbonila. Já o componente de açúcar (também conhecido como daunosamina) está ligado a um dos anéis por uma ligação glicosídica e é composto por uma porção 3-amino-2,3,4-trideoxi-L-fucosil (TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2013).

Os efeitos da DOXO iniciam-se quando a droga passa por difusão pela membrana citoplasmática, e no citoplasma a mesma é convertida em uma semiquinona, gerando espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* – ROS), espécies reativas de nitrogênio (*reactive nitrogen species* – RNS), radicais livres e causando estresse oxidativo. Como resultado, as mitocôndrias liberam a proteína do citocromo C, desencadeando a cascata da caspase, que leva à morte celular. A partir do citoplasma, a DOXO se transloca para o núcleo da célula, onde se intercala entre as hélices da dupla-fita de DNA, inibindo as topoisomerasas I e II. O dano resultante ao DNA leva à geração de mais radicais livres, alquilação e ativação da via p53, inibindo a proliferação celular e induzindo apoptose (CAPPETTA *et al.*, 2017; FRANCO; VAIDYA; AIT-OU DHIA, 2018; HENRIKSEN, 2018).

Alguns fatores são importantes para o acúmulo de DOXO no miocárdio. Os cardiomiócitos são células que possuem um grande número de mitocôndrias, necessárias para a produção de adenosina de tri-fosfato (ATP) como molécula energética para a contração muscular. Além disso, os cardiomiócitos possuem um baixo conteúdo de enzimas antioxidantes. O seu acúmulo nas mitocôndrias de células do miocárdio inibe a fosforilação oxidativa e gera mais ROS, o que leva a uma vacuolização e fibrose intersticial endomiocárdica. A cardiotoxicidade aguda/subaguda pode iniciar no momento da infusão ou nos primeiros 2 ou 3 dias e inclui sintomas como arritmias, taquicardia supraventricular e instabilidade hemodinâmica (JASRA; ANAMPA, 2018; KOLEINI; KARDAMI, 2017). O mecanismo de ação da DOXO sobre as células tumorais e cardiomiócitos está resumido na **Figura 2**.

Figura 2 - Mecanismo de lesão celular mediada por antraciclinas e morte celular em células tumorais e cardiomiócitos

O efeito terapêutico da DOXO nas células tumorais é mediado pela inibição da Top 2 α . Em cardiomiócitos, a Top 2 β é também inibida. A inibição de topoisomerase-2 em ambos os tipos de células causa quebras de fitas-duplas de DNA e disfunção mitocondrial, levando à ativação de vias de morte celular e acúmulo de ROS. A lesão cardíaca precoce pode ser detectada por meio da quantificação da cTnI circulante. DNA: ácido desoxirribonucleico; Top 2 α : topoisomerase-2 α ; Top 2 β : topoisomerase-2 β ; cTnI, troponina I; VE: ventrículo esquerdo; ROS: espécies reativas de oxigênio. Fonte: Adaptado de HENRIKSEN, 2018

O uso clínico da DOXO pode ser limitado devido à sua toxicidade, a curto e longo prazo. A toxicidade a curto prazo, como náuseas e a neutropenia, podem ser mais bem manejadas à medida que os cuidados de suporte melhoram. No entanto, esses efeitos podem apresentar-se como problemas sérios, principalmente em pacientes idosos e com comorbidades (SHAH, A. N.; GRADISHAR, 2018; SWAIN; WHALEY; EWER, 2003).

Efeitos tóxicos menos frequentes, porém, importantes a longo prazo, incluem cardiotoxicidade e doença maligna hematológica. A lesão subclínica inicial das células do miocárdio é seguida por um declínio assintomático da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) e finalmente progride para IC sintomática, se não tratada. A prevalência da IC foi estimada em 5%, 26% e 48% em pacientes que receberam as doses de 400, 550 e 700 mg/m², respectivamente, evidenciando que é um efeito adverso dose-dependente (SHAH, A. N.; GRADISHAR, 2018; SWAIN; WHALEY; EWER, 2003). Essas estimativas foram calculadas levando-se em consideração os critérios clínicos e cardiográficos, e são anteriores aos critérios aplicados nesse estudo que leva em consideração a quantificação de biomarcadores plasmáticos.

1.2.2.2 Cardiotoxicidade

Pacientes em regime quimioterápico à base de antraciclinas possuem um risco 5 vezes maior de desenvolver cardiotoxicidade do que aqueles que não usam antraciclina. O risco também é maior quando comparados aos pacientes tratados apenas com taxanos (MANTARRO *et al.*, 2016; SMITH *et al.*, 2010).

A cardiomiopatia secundária à quimioterapia pelas antraciclinas compreende uma patologia de espectro amplo, que varia desde um declínio assintomático da função sistólica quantificada pela FEVE até o desenvolvimento de uma IC com sinais e sintomas clínicos (HENRIKSEN, 2018). A relação entre o declínio assintomático da FEVE e o desenvolvimento subsequente de IC não é completamente compreendida, porém, está associada à um risco aumentado de ICC (insuficiência cardíaca congestiva) e morte (WANG *et al.*, 2003).

Outros fatores, além da dose-cumulativa, estão envolvidos no risco de desenvolvimento da cardiotoxicidade. Entre eles, pode-se destacar: sexo feminino, idade maior que 65 ou menor que 18 anos, insuficiência renal, exposição cardíaca concomitante à radioterapia e doenças cardíacas pré-existentes (como hipertensão, doença valvar, fibrilação atrial) (ZAMORANO *et al.*, 2016). A detecção precoce da cardiotoxicidade é importante para que se possa considerar a modificação do tratamento em curso, alteração da frequência de acompanhamento subsequente e fornecimento de intervenções

diretas para redução do risco de disfunção cardíaca (CHAUDRY; BANCHS; CHAVEZ-MACGREGOR, 2016).

Evidências de lesão e morte de cardiomiócitos, incluindo perda miofibrilar e vacuolização, encontradas em biópsia do tecido endomiocárdico, podem ser observadas durante a quimioterapia por antraciclinas com doses cumulativas abaixo de 200 mg/m². A biópsia e a FEVE possuem baixa sensibilidade para detectar lesões celulares no miocárdio. Isso sugere que as alterações estruturais celulares observadas durante a quimioterapia precedem o desenvolvimento da DVE (HENRIKSEN, 2018). Além disso, a utilização isoladamente da FEVE como marcador para cardiotoxicidade subclínica é limitada. A medida é calculada por meio de diferentes métodos ecocardiográficos, cada um com suas próprias limitações, o que acarreta variação intra- e inter-observador, podendo chegar até a 16% (MCGOWAN *et al.*, 2017).

Como alternativa à FEVE e outros métodos gráficos, biomarcadores cardíacos, como a cTnI e seu ensaio de alta-sensibilidade (hscTnI), o peptídeo natriurético tipo B (BNP) e o NT-próBNP têm sido investigados como marcadores de lesão miocárdica precoce (HENRIKSEN, 2018; LEVIS; BINKLEY; SHAPIRO, 2017).

A troponina é o biomarcador padrão-ouro para detectar lesão do miocárdio. A sua relação com a cardiotoxicidade secundária à quimioterapia tem sido amplamente estudada por *Cardinale et al.*, que demonstraram em vários estudos a eficácia das medições precoces de cTnI no prognóstico do decréscimo futuro da FEVE em pacientes submetidos à quimioterapia (CARDINALE, *et al.*, 2000, 2002, 2004, 2006, 2010; CHAUDRY; BANCHS; CHAVEZ-MACGREGOR, 2016).

A elevação da cTnI ocorre em 21 - 40% dos pacientes após quimioterapia com antraciclinas, independentemente do tipo de ensaio utilizado para dosagem. O aumento da cTnI pode representar a apoptose de cardiomiócitos e a degradação da miofibrila, mais do que propriamente a necrose. Níveis séricos elevados de cTnI antecedem o decréscimo da FEVE na cardiotoxicidade, da mesma forma como ocorre em eventos cardiovasculares adversos maiores

(CHUNG *et al.*, 2016; MCGOWAN *et al.*, 2017). Níveis aumentados cTnI mostraram associação independente com a ocorrência de cardiotoxicidade, sugerindo que sua dosagem pode ser incluída na identificação do risco de cardiotoxicidade em pacientes com câncer de mama em tratamento com DOXO (SIMÕES *et al.*, 2021).

O BNP é produzido pelos ventrículos cardíacos. Seu papel como biomarcador foi bem definido no diagnóstico da IC, com FEVE reduzida ou mesmo preservada. Uma elevação contínua do BNP acima de 100 ng/mL tem sido preditiva do desenvolvimento de IC entre pacientes com câncer de mama. As concentrações de BNP estão correlacionadas positivamente com a dose cumulativa de antraciclina e negativamente com a FEVE (PICHON *et al.*, 2005).

O principal fator para a liberação e elevação sérica do BNP e do NT-próBNP é o estresse sobre a parede ventricular e não a lesão miocárdica, sendo que as primeiras observações em relação ao BNP na quimioterapia com antraciclina indicaram que níveis persistentemente elevados de BNP após a administração de antraciclina foram associados a piores desfechos (WITTELES, 2016). Os níveis séricos de BNP mostraram-se significativamente mais altos após cada ciclo de quimioterapia com antraciclina em indivíduos que tiveram eventos cardíacos (LENIHAN *et al.*, 2016). Também foi demonstrada uma associação entre o aumento de níveis séricos de NT-próBNP após 72 horas da quimioterapia e um decréscimo da FEVE (SANDRI *et al.*, 2005).

A definição e os critérios de diagnóstico da cardiotoxicidade foram modificados ao longo do tempo. O diagnóstico de cardiotoxicidade mais amplamente reconhecido é baseado nas alterações da FEVE. De acordo com a Diretriz Brasileira de Cardio-oncologia (HAJJAR, LUDHMILA ABRAHÃ\POUNDSO *et al.*, 2020), o diagnóstico de cardiotoxicidade pode ser realizado pela confirmação de alteração cardiovascular nova durante ou após o tratamento, seja de natureza clínica e/ou alteração em biomarcadores e/ou em exame de imagem cardiovascular, tendo sido excluídas outras etiologias, sendo a ecocardiografia o método de escolha para detectar disfunção miocárdica relacionada ao tratamento do câncer. A mesma diretriz orienta que a

ecocardiografia tridimensional é o melhor método ecocardiográfico para medir a FEVE no paciente com câncer.

Uma queda abaixo de um determinado nível ou uma diminuição absoluta na FEVE pode ser interpretada como um sinal precoce de possível cardiotoxicidade, mas os limiares para decisões clínicas podem variar a depender de diferentes autores e diretrizes. Além disso, conforme já exposto, a medição da FEVE está sujeita a uma importante variabilidade intra e inter-observador (LEVIS; BINKLEY; SHAPIRO, 2017).

Assim, foi proposta por Pareek et al (2018) uma nova classificação (**Quadro 1**) para cardiotoxicidade que contempla, além dos parâmetros derivados de exames ecocardiográficos, como a FEVE, variáveis clínicas mais relevantes e biomarcadores cardíacos, tendo por base protocolos clínicos do *Royal Brompton Hospital* (Londres, Reino Unido) (PAREEK et al., 2018).

Quadro 1 - Classificação e definição da cardiotoxicidade em pacientes sob tratamento de câncer de acordo com os protocolos do Royal Brompton Hospital (Londres, Reino Unido).

Classificação	Definição
Cardiotoxicidade bioquímica precoce	Novo aumento de níveis séricos de BNP ou de cTnI, porém imagens cardíacas normais. (Se normal na linha de base, então qualquer aumento acima do limite superior do normal. Se anormal na linha de base, então aumento de 20%).
Cardiotoxicidade funcional precoce	Nova redução no GLS ou disfunção diastólica grau III-IV e biomarcadores normais.

Cardiotoxicidade mista precoce	FEVE normal com biomarcadores anormais e disfunção diastólica/GLS.
HFpEF sintomática	HFpEF sintomática
LVSD assintomática	Nova redução da FEVE para <50%, ou redução superior a 10% da FEVE, para FEVE <55%.
LVSD sintomático	Redução sintomática da FEVE <50%, ou redução superior a 10% da FEVE, para FEVE <55%.

FEVE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo; BNP: peptídeo natriurético tipo B; cTnI: troponina I; GLS: *global longitudinal strain* - tensão longitudinal global; HFpEF, insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada; LVSD: disfunção sistólica ventricular esquerda. Fonte: PAREEK *et al.*, 2018.

Tal classificação tem por objetivos: identificar pacientes com risco cardiovascular basal aumentado prévio ao tratamento do câncer; minimizar seu risco utilizando estratégias de prevenção primária; diagnosticar e tratar a toxicidade miocárdica durante ou após o tratamento do câncer; apoiar o paciente em seu regime de tratamento de câncer com um programa de monitoramento personalizado e acompanhar adequadamente, a médio e longo prazo, os pacientes com doença cardiovascular secundária ao tratamento de câncer (PAREEK *et al.*, 2018).

De acordo com a diretriz de cardio-oncologia da SBC, a DVE relacionada à terapia do câncer é definida como uma redução $\geq 10\%$ na FEVE para um valor abaixo do limite inferior da normalidade (FEVE < 50%). A monitorização da cardiotoxicidade por meio da dosagem de biomarcadores pode ser considerada para a detecção de lesão miocárdica precoce em pacientes de alto risco, devido a fatores prévios, ou expostos a fármacos como antraciclinas e trastuzumabe. A presença de níveis elevados de biomarcadores (NT-próBNP e troponina) é indicativa de risco aumentado de cardiotoxicidade (HAJJAR, LUDHMILA ABRAHÃO *et al.*, 2020).

De fato, as diretrizes para monitoramento da cardiotoxicidade em pacientes com câncer em tratamento quimioterápico é bastante variável dentre as organizações internacionais e algumas podem ser resumidas no **Quadro 2** (LEVIS; BINKLEY; SHAPIRO, 2017).

Quadro 2 - Monitoramento da cardiotoxicidade em pacientes com câncer em tratamento quimioterápico.

Organização	Quimioterapia com antracíclicinas – Recomendações		
	Antes	Durante	Depois
<i>American Cancer Society / American Society of Clinical Oncology</i>	Obter histórico médico detalhado e realizar exames físicos (nenhum exame de imagem cardíaca é recomendado). Conscientização de pacientes sobre os fatores de risco cardíacos e recomendações para estilo de vida saudável.	Orientar os pacientes para relatar sintomas relevantes (por exemplo, falta de ar ou fadiga) ao prestador de cuidados primários.	Nenhum específico além do acompanhamento normal com o prestador de cuidados primários.
<i>National Comprehensive Cancer Network</i>	Obter histórico médico detalhado e realizar exames físicos para avaliar a presença de fatores de risco cardíacos. Realizar ecocardiograma 2D	Abordar os fatores de risco subjacentes (por exemplo, diabetes, obesidade, hipertensão).	Considerar ecocardiograma 2D em pacientes com um ou mais fatores de risco, dentro de 1 ano após o término da quimioterapia com antraciclina. Considerar encaminhamento ao cardiologista
<i>European Society for Medical Oncology</i>	Avaliação clínica para fatores de risco cardíacos e comorbidades. Avaliação obrigatória da FEVE e dosagem de biomarcadores cardíacos séricos na linha de base (BNP, e	Monitoramento seriado da FEVE, aos 3, 6 e 9 meses durante a quimioterapia. Dosagem de biomarcadores cardíacos séricos é sugerida (cTnI e	Acompanhamento e monitoramento da função cardíaca em 12 e 18 meses. Avaliação de longo prazo de função cardíaca em 4 e 10 anos após terapia

	cTnI); Considerar o uso de DOXO encapsulada em lipossoma e medicamentos cardioprotetores (como dexrazoxano, inibidores da ECA, etc) em pacientes de alto risco	BNP) a cada ciclo. Se houver redução da FEVE para < 40%, interromper a quimioterapia e iniciar tratamento com medicamentos cardíacos. Em pacientes assintomáticos, mas com redução da FEVE após a quimioterapia com antraciclina, iniciar tratamento com medicamentos cardíacos.	com antraciclina se o paciente recebeu dose cumulativa de DOXO > 240 mg/m² ou epirrubicina > 360 mg/m².
<i>Canadian Cardiovascular Society</i>	Exame físico e avaliação de fatores de risco cardíaco. Avaliação da FEVE basal. Para pacientes considerados de alto risco de disfunção ventricular esquerda, considerar início de terapia profilática com medicamentos cardíacos.	Recomendar avaliação da FEVE e biomarcadores séricos (BNP, cTnI) durante a quimioterapia. Se houver redução da FEVE (<40%), interromper a quimioterapia e iniciar medicamentos cardíacos. Em pacientes com redução da FEVE > 10% que o basal, ou ainda se a FEVE for < 53%, considerar início de medicamentos cardíacos.	Recomendar acompanhamento após a conclusão de terapia anticâncer com avaliação da FEVE
<i>American Society of Echocardiography and European Association of Cardiovascular</i>	Ao usar drogas que causam cardiotoxicidade, medir a FEVE basal, GLS e cTnI.	Se FEVE > 53%, GLS > limites da normalidade e níveis normais de troponina I, deve-se avaliar a FEVE ao completar a quimioterapia com antraciclina (para 240 mg/m² de DOXO	Repetir cada procedimento 6 meses após conclusão do tratamento.

<i>Imaging</i>		ou equivalente). Se FEVE < 53%, ou GLS < limites da normalidade ou níveis elevados de troponina I, então encaminhar paciente ao cardiologista.	
----------------	--	---	--

FEVE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo; BNP: peptídeo natriurético tipo B; cTnI: troponina I; ECA: enzima conversora da angiotensina; GLS: *global longitudinal strain* - tensão longitudinal global

Fonte: LEVIS; BINKLEY; SHAPIRO, 2017.

Os avanços na sobrevida em longo prazo de mulheres com câncer de mama em estágio inicial tornam as toxicidades tardia e crônica uma preocupação particular. Em uma análise de mulheres com câncer de mama no banco de dados *Surveillance, Epidemiology, and End Results Program*, a morte por causas cardíacas foi semelhante à morte por câncer de mama (15,9% vs 15,1%, respectivamente), reforçando a importância da cardiotoxicidade no óbito destas pacientes (PATNAIK *et al.*, 2011).

A trombose, além da cardiotoxicidade, também é um evento importante em pacientes com câncer, sobretudo naqueles em tratamento quimioterápico. Os mecanismos pelos quais a quimioterapia favorece um estado pró-trombótico não estão completamente elucidados (SWYSTUN *et al.*, 2009) e a questão será melhor abordada nas seções seguintes do texto.

1.2.2.3 Novos biomarcadores cardiovasculares

Os biomarcadores séricos são uma ferramenta importante na avaliação de risco inicial e diagnóstico de DCV em pacientes com câncer que recebem tratamentos de câncer cardiotóxicos (PUDIL *et al.*, 2020). Com isso, nessa seção, serão abordados novos biomarcadores séricos para avaliação de DCV, além da cTnI e do NT-próBNP, que já foram discutidos em seções anteriores.

Em uma coorte multicêntrica de 78 pacientes com câncer de mama submetidas à quimioterapia com DOXO e trastuzumabe, foram avaliados 8 biomarcadores séricos, a saber: hsTnI, NT-próBNP, hsPCR (proteína C-reativa de alta sensibilidade), GDF-15 (*Growth/differentiation factor 15*), MPO

(mieloperoxidase), PIGF (fator de crescimento placentário), sFlt-1 (tirosina quinase-1 solúvel do tipo Fms) e gal-3 (galectina 3) (PUTT *et al.*, 2015). Nesse estudo, após 3 meses de início da quimioterapia, observou-se um aumento nos níveis séricos de GDF-15, MPO, PIGF, hsPCR e hscTnI; após 6 meses: GDF-15, PIGF, hsPCR e hscTnI; após 9 meses: GDF-15, PIGF e hscTnI; e após 12 e 15 meses de seguimento, os níveis apenas de GDF-15, PIGF e hscTnI permaneceram elevados em relação à linha de base (PUTT *et al.*, 2015).

Em outro estudo longitudinal com pacientes com câncer de mama (HER2+) em estágio inicial, foram encontrados aumentos significativos nos níveis séricos de GDF-15 após o quarto ciclo de quimioterapia adjuvante com trastuzumabe. Não foram encontradas diferenças para os demais biomarcadores avaliados (KIRKHAM *et al.*, 2022).

O GDF-15 é uma citocina da família do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) encontrada em baixa quantidade nos tecidos (exceto pela placenta e próstata) e no plasma (EMMERSON *et al.*, 2018). Os níveis de GDF-15 estão elevados na fase pré-clínica da IC e sua associação com o NT-próBNP foi capaz de aumentar a acurácia diagnóstica para IC, inclusive na sua fase inicial (RULLMAN *et al.*, 2020). O GDF-15 é um biomarcador sérico cuja expressão parece ser afetada por estresse, injúria tecidual e inflamação, embora seu eixo fisiopatológico ainda não seja completamente entendido. Contudo, sua produção no miocárdio foi demonstrada experimentalmente em resposta à injúria isquêmica ou sobrecarga cardíaca (MAY *et al.*, 2021).

LIGHT é uma citocina com atividade pró-inflamatória, pertence à superfamília do fator de necrose tumoral 14 (TNFS14) é expressa por diferentes tipos de células imunes e possui papéis multifacetados na estimulação de células T e respostas imunes inatas. LIGHT sinaliza através de dois receptores e tem funções distintas que são dependentes do tipo de célula, mas as interações com esses tipos de receptores têm implicações relacionadas ao sistema imunológico na biologia do tumor (SKEATE *et al.*, 2020; WARD-KAVANAGH *et al.*, 2016).

As proteínas dependentes de vitamina K estão presentes no sangue e em uma ampla variedade de tecidos por todo o corpo e exercem uma ampla gama de funções, por exemplo, como fatores de coagulação do sangue na hemostasia. Uma dessas proteínas tem ganhado cada vez mais atenção: a proteína da matriz-carboxiglutamato (Gla) (MGP), um potente inibidor da calcificação presente na cartilagem e na parede do vaso, onde é sintetizada por condrócitos e células do músculo liso vascular, respectivamente. Biologicamente inativo, a ucMGP é um marcador de estado vascular da vitamina K e é descrito como preditor de mortalidade em pacientes com insuficiência cardíaca e estenose aórtica (CRANENBURG *et al.*, 2008; MAYER *et al.*, 2014).

O antígeno de diferenciação CD14 é um receptor de reconhecimento de padrões que aumenta as respostas imunes inatas. É um glicoproteína expressa principalmente por células mieloides que desempenha um papel fundamental na inflamação. Formas solúveis de CD14 (sCD14) podem ser secretadas por células ativadas, que liberam CD14 por liberação dependente ou independente de proteinase. Níveis plasmáticos de sCD14 possuem relação com mal prognóstico na insuficiência cardíaca crônica (AL-KINDI *et al.*, 2020; WRIGHT *et al.*, 1990).

FABPs (proteínas de ligação a ácidos graxos) são proteínas expressas em quase todos os tecidos. São responsáveis pelo controle do transporte, metabolismo e armazenamento de ácidos graxos e são propostos como reguladores centrais do metabolismo lipídico, inflamação e homeostase energética (THUMSER; MOORE; PLANT, 2014)

FABP3 é uma proteína citosólica encontrada principalmente no coração, mas também no músculo, cérebro e rim. Alguns estudos sugeriram que FABP3 tem sensibilidade superior à troponina para detectar lesão isquêmica e lesão cardíaca associada à insuficiência cardíaca congestiva (FATHIL *et al.*, 2015; MION *et al.*, 2007; ZHEN *et al.*, 2007)

A FABP4 é expressa principalmente em adipócitos e macrófagos. É uma das proteínas mais abundantes em adipócitos, regulando a lipólise e adipogênese. Desempenha um papel importante no desenvolvimento de resistência à

insulina e aterosclerose. Os níveis circulantes de FABP4 estão associados a vários aspectos da síndrome metabólica e doença cardiovascular (FURUHASHI, 2019; PRENTICE; SAKSI; HOTAMISLIGIL, 2019).

1.2.3 Hemostasia e câncer de mama

Por mais de um século, é conhecida a associação entre câncer e trombose, a qual foi descrita pela primeira vez em 1823 por Jean-Baptiste Bouillard, e mais tarde confirmada por Armand Trousseau ao relatarem a associação entre o câncer gástrico e trombose (BOUILLAUD; BOUILLAUD, 1823; TROUSSEAU, 1865).

O câncer está associado a um aumento do risco (quatro a sete vezes) da ocorrência de TEV (HORSTED; WEST; GRAINGE, 2012; TIMP *et al.*, 2013). Mesmo sem eventos trombóticos, a maioria dos pacientes com câncer apresentam alterações hemostáticas que são detectáveis por testes laboratoriais, que revelam diferentes graus da ativação da coagulação e caracterizam um estado de hipercoagulabilidade desses indivíduos (FALANGA; RUSSO, 2012).

O tipo mais comum de TEV é a trombose venosa profunda (TVP), mais frequente nos membros inferiores. O coágulo formado pode desprender-se, levando a uma embolia, que se direcionada pelos vasos que suprem os pulmões causa a embolia pulmonar, levando ao risco de morte. O termo TEV refere-se tanto ao TVP quanto ao tromboembolismo pulmonar. Existem muitos fatores de risco para o desenvolvimento de TEV, incluindo idade, imobilidade, certos medicamentos e algumas condições, como câncer. Cerca de 20% das mortes por TEV ocorrem entre pacientes com câncer e, mais importante, pacientes com câncer e TEV têm uma maior risco de morte do que aqueles que não têm TEV (HORSTED; WEST; GRAINGE, 2012).

Em um estudo com mais de 17.000 pacientes nos Estados Unidos, observou-se uma ocorrência de TEV em 12,6% da coorte de pacientes com câncer dentro de 12 meses após o início da quimioterapia, contra apenas 1,4% de ocorrência em pacientes não-oncológicos. A maioria dos eventos de TEV na coorte de câncer ocorreu logo após o início da quimioterapia: entre os

pacientes com TEV, 18,1% tiveram seu primeiro evento no primeiro mês, 47% tiveram seu primeiro evento nos 3 primeiros meses e 72,5% tiveram seu primeiro evento nos primeiros 6 meses (KHORANA *et al.*, 2013).

A patogênese da coagulopatia associada ao câncer é complexa e multifatorial. Importante destacar que as células tumorais adquirem a capacidade de ativar o sistema hemostático do paciente, sendo tal fenômeno associado à ativação dos mesmos oncogenes responsáveis pela transformação neoplásica celular. Por esse processo, os tecidos tumorais tornam-se capazes de expressar diferentes proteínas pró-coagulantes, como o fator tissular (FT) e o fator VII, que contribuem para a hipercoagulabilidade (MAGNUS *et al.*, 2014). De acordo com Falanga *et al.* (2017), além do FT, as células tumorais também são responsáveis pela expressão e liberação de MPs e proteínas do sistema fibrinolítico (FALANGA *et al.*, 2017).

O risco de TEV em pacientes com câncer também é influenciado pelas características individuais do paciente, como história pregressa de evento trombótico e idade. Além disso, alguns pacientes com câncer também apresentam variantes genéticas pró-trombóticas, como aquelas localizadas no gene da protrombina ou fator V de Leiden, ou ainda, deficiências em anti-trombina, na proteína C ou na proteína S. Em alguns tipos de câncer pode haver ainda o aumento no número de leucócitos e plaquetas, contribuindo para diferentes gravidades de tromboembolismo (HISADA; MACKMAN, 2017). Já no câncer de mama, elementos do sistema hemostático, incluindo plaquetas, coagulação sanguínea e fibrinólise podem afetar muitos dos processos conhecidos por mediar a progressão do tumor. Assim, a interação entre hemostasia e câncer é bidirecional (LAL; DITTUS; HOLMES, 2013).

A quimioterapia é um fator de risco adquirido e bem reconhecido para trombose. Além dos fatores pró-trombóticos associados à presença do tumor, a quimioterapia pode aumentar o risco de ocorrência de trombose em até 5 – 6 vezes. Em pacientes com câncer de mama, o risco basal para trombose é menor que 1%, mas aumenta significativamente após o tratamento quimioterápico, chegando à 5 - 17%, dependendo do estágio do câncer e do

tipo de quimioterapia ou terapia hormonal administrada (MÉDIONI; GUASTALLA; DROUET, 2012; SWYSTUN; MUKHERJEE; LIAW, 2011).

A quimioterapia potencialmente pode induzir a liberação de vesículas extracelulares (VEs) do tumor, sangue ou de células endoteliais. As VEs podem desempenhar um papel importante na tumorigênese, progressão do tumor, metástase e trombose associada ao câncer. A sua função pró-trombótica é atribuída principalmente à expressão de FT e correlacionam-se com o estágio do tumor. As principais VEs observadas (> 80%) são as derivadas de plaquetas, com níveis correlacionados com a contagem do fragmento 1+2 da protrombina (F1+2), sugerindo um papel na hipercoagulabilidade (CAMPELLO *et al.*, 2018; LACROIX *et al.*, 2019; TOTH *et al.*, 2008).

1.2.4 Vesículas extracelulares

O termo “vesículas extracelulares (VEs)” designa um conjunto de partículas naturalmente liberadas por células, que são delimitadas por uma bicamada lipídica e que não podem replicar-se, ou seja, não possuem núcleo (RUSSELL *et al.*, 2019).

Técnicas avançadas que utilizam imagens para determinar a liberação das vesículas, e assim sua biogênese exata, nem sempre são utilizadas por indisponibilidade e dificuldade de execução. Para confirmação da origem MP, é sugerido que a classificação seja feita tendo em base suas características físicas (como tamanho e densidade), sua composição bioquímica (marcadores de superfícies, por exemplo) e sua origem celular (condição de origem, como vesículas derivadas de podócitos, oncossomos ou corpos apoptóticos) (THÉRY *et al.*, 2018; YÁÑEZ-MÓ *et al.*, 2015).

As VEs são estáveis no ambiente extracelular devido à sua bicamada lipídica que protege seu conteúdo de degradação enzimática. Possuem abundância no meio plasmático, com uma concentração sérica estimada em torno de 10^{10} VEs por mL. Além disso, carregam proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e demais moléculas que refletem seus tecidos de origem e as condições das células que

as liberaram. Essas características despertam o estudo e uso das VEs como potenciais biomarcadores (YARANA *et al.*, 2018).

Os exossomos são corpos vesiculares com uma membrana composta por uma bicamada lipídica (30 - 150 nm de diâmetro) liberados através da membrana plasmática. São ativamente secretados por quase todos os tipos de células eucarióticas e podem ser encontrados em vários fluidos corporais, como urina, sangue, leite materno, líquido céfalo-raquidiano, saliva, bile, líquido ascítico, lágrima, sêmen e líquido amniótico (JEPPESSEN *et al.*, 2019; PEGTEL; GOULD, 2019; ZHU *et al.*, 2020). Há um certo debate se os exossomos externalizam fosfatidilserina (PS). De certo, exossomos são ricos em balsas lipídicas e tem sido demonstrado conterem tanto conteúdos celulares citosólicos (proteínas e RNA), como material nuclear (BURGER *et al.*, 2013; ZOMER *et al.*, 2010).

As MPs, por sua vez, são liberadas das células sob condições de estresse, entretanto, a morte celular ou apoptose não são requisitos obrigatórios para sua formação, visto que células ativadas (por exemplo, endoteliais e plaquetas) são capazes de liberar essas partículas. Uma vez liberadas, as MPs contêm proteínas de superfície da célula de origem, juntamente com conteúdo citosólico (incluindo enzimas, RNA e possivelmente, DNA). As MPs são distinguíveis de outras VEs com base no tamanho, mecanismo de formação e conteúdo (BURGER *et al.*, 2013; COCUCCHI; MELDOLESI, 2015; ZABOROWSKI *et al.*, 2015).

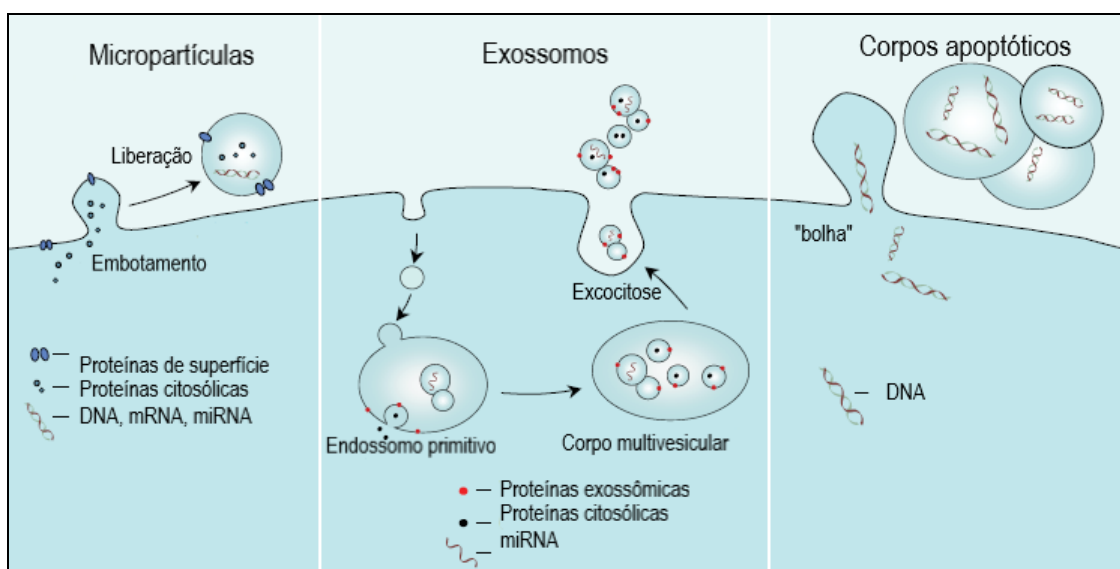
Ao contrário dos exossomos, as MPs originam-se diretamente da membrana plasmática. O processo que leva à geração das MPs começa com a formação de botões externos da membrana, seguido pela fissão e subsequente liberação das vesículas no espaço extracelular. Para isso, a membrana plasmática sofre vários rearranjos moleculares nos locais de origem das MPs, incluindo alterações na composição de lipídios, proteínas e nos níveis de Ca^{2+} . A externalização da PS, que ocorre com seu processo de formação, é uma das principais características das MPs (MINCIACCHI; FREEMAN; DI VIZIO, 2015).

Além dos rearranjos na composição da membrana plasmática, proteínas responsáveis pela manutenção da forma celular e do citoesqueleto podem

estar envolvidas na biogênese das MPs, por meio da regulação da dinâmica da actina (MINCIACCHI; FREEMAN; DI VIZIO, 2015). O alongamento resultante dos filamentos de actina ao longo das membranas plasmáticas leva à formação de uma estrutura de "anel de actina" que serve como uma etapa essencial para a maturação das MPs, sugerindo que a extensa reorganização do citoesqueleto de actina pode desempenhar um papel no processo de formação de microvesículas (CRESPIN *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2012).

As células em apoptose também são capazes de liberar VEs de 1–5 μm de diâmetro, que são referidas como corpos apoptóticos (LAWSON *et al.*, 2016). Os mecanismos de formação das VEs estão representados na **Figura 3**.

Figura 3 - Representação esquemática dos mecanismos de formação das MPs, exossomos e corpos apoptóticos.



Legenda: DNA: ácido desoxirribonucléico; RNA: ácido ribonucléico; mRNA: RNA mensageiro; miRNA: micro-RNA. Fonte: Adaptado de LAWSON *et al.*, 2016.

A citometria de fluxo é umas das abordagens mais populares para o estudo de VEs, pois é um método de alto rendimento para quantificar e fenotipar um grande número de vesículas, além de ser uma tecnologia disponível na maioria das instituições de pesquisa (LANNIGAN; ERDBRUEGGER, 2017; SZATANEK *et al.*, 2017). A anexina V é capaz de ligar-se especificamente com a PS, constituindo, portanto, um marcador específico para MPs, sendo então bastante utilizada na identificação e quantificação das MPs pela citometria de fluxo (CONNOR *et al.*, 2010; JEPPESEN *et al.*, 2019).

O envolvimento de MPs no processo de coagulação é evidente desde o momento de sua descoberta. A atividade pró-coagulante está principalmente relacionada à superfície externa carregada negativamente de sua membrana plasmática, devido à presença de PS. A PS atrai eletrostaticamente o segmento de carga positiva das proteínas de coagulação, como os fatores VII, IX e X e protrombina. A expressão de FT na superfície das MPs também é outro fator determinante nesse contexto (PUDDU *et al.*, 2010; VOUKALIS; SHANTSILA; LIP, 2019). Outro possível mecanismo de ação pró-trombótica das MPs é a inibição do processo fibrinolítico. A expressão de proteínas na membrana plasmática de MPs, como o inibidor do ativador do plasminogênio-1 e a proteína S, leva à amplificação da trombogênese por supressão da fibrinólise (ALEXANDRU *et al.*, 2015; SOMAJO *et al.*, 2014).

1.2.4.1 Fator tissular

O interesse pela pesquisa envolvendo o FT remonta à 1834, quando *De Blaineville* relatou que a administração endovenosa de uma suspensão tissular de tecido cerebral em uma veia levou à formação de coágulos e morte imediata do animal (BÄCHLI, 2000). O FT é tradicionalmente reconhecido por exercer um papel importante no câncer. Diversos tipos de células tumorais são conhecidos por expressarem constitutivamente o FT em suas superfícies, e possivelmente podem inclusive influenciar células hospedeiras adjacentes, como monócitos e células endoteliais, a produzirem FT (WOJTUKIEWICZ *et al.*, 2001).

O FT também é conhecido como trombocinase, tromboplastina, CD142 ou fator III da coagulação sanguínea. É uma glicoproteína transmembranda de 47 kDa (263 aminoácidos) que consiste em três domínios. Seu domínio extracelular é constituído por dois módulos de fibronectina tipo III unidos por uma região de dobradiça, o qual liga-se ao fator VII com alta afinidade, ou sua forma ativada VIIa (EILERTSEN; ØSTERUD, 2004; GARDINER *et al.*, 2015; KONIGSBERG *et al.*, 2001).

O FT atua como um receptor do complexo fator VII/VIIa, aumentando a atividade catalítica do fator VIIa em mais de um milhão de vezes, o que ativa os fatores IX e X da coagulação, para assim iniciar a formação de trombina.

Encontra-se presente no plasma sob duas formas principais, sendo uma cadeia completa da proteína ancorada na superfície das MPs, ou na forma solúvel como um arranjo proteico alternativo. Considera-se que a forma associada às MPs tenha uma maior atividade pró-trombótica (VAN DER POL *et al.*, 2010).

As FTMPs podem derivar-se de monócitos, neutrófilos, células endoteliais e plaquetas como resposta a várias condições patológicas (MACKMAN; TILLEY; KEY, 2007). Diversos estudos têm sugerido fortemente que a identificação das FTMPs pode possuir valor prognóstico e importância na identificação de pacientes com câncer que possuem risco aumentado para ocorrência de TEV (OWENS; MACKMAN, 2011). Em muitos tipos de câncer, como o câncer de mama e pancreático, a expressão do FT está associada com um fenótipo pró-trombótico e correlaciona-se com o grau e progressão do tumor (GHELDOLF *et al.*, 2013).

Em um estudo realizado por MI *et al* (2017) com 87 pacientes com diagnóstico de câncer de mama prévio ao tratamento (quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal ou cirurgia), foi demonstrado que níveis plasmáticos elevados de FTMPs estão diretamente relacionados ao estado hipercoagulável, apresentando correlação negativa com o TP e o TTP e uma correlação positiva com os níveis plasmáticos de dímero D e fibrinogênio (MI *et al.*, 2017).

A expressão de FT no microambiente do câncer de mama possui um dinamismo complexo, tendo sua regulação exercida por oncogenes, hipóxia e TGF- β . A ativação oncogênica de HER2 e de EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico) aumenta a expressão do FT em células de câncer de mama. A hipóxia não apenas aumenta a expressão de FT, mas também aumenta a síntese ectópica de seu ligante fator VIIa em células de câncer de mama por meio do fator 2 α indutível por hipóxia (HIF-2 α) (KOIZUME *et al.*, 2006; YU *et al.*, 2010).

As células do câncer de mama são capazes de induzir a expressão de FT em células endoteliais e estromais vasculares por meio da produção de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e TGF- β , respectivamente. Oncogenes ativados (como MET e PML-RAR- α) ou perda de genes supressores de tumor

(como PTEN e p53) modificam a expressão de FT e de outros mediadores de coagulopatia, como o inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 e a ciclooxigenase de uma maneira específica (GARNIER *et al.*, 2012).

1.2.4.2 Plaquetas

O sinal biológico para o início da coagulação plaquetária é emitido pela exposição de componentes de adesão presentes no subendotélio, que normalmente estão ocultos do sangue pelo endotélio. As plaquetas interagem com as proteínas de adesão por meio de seus receptores de adesão. *In vivo*, sob condições de tensão de cisalhamento, ocorre a ligação do fator de von Willebrand (*von Willebrand Factor* - vWF) a seus receptores, como a glicoproteína Ib-IX-V, ancorando as plaquetas então no subendotélio (JURASZ; ALONSO-ESCOLANO; RADOMSKI, 2004).

A resposta das plaquetas (agregação plaquetária) à trombina é significativamente maior em pacientes com câncer de mama nos seus vários estágios do que em indivíduos saudáveis, o que parece ser dependente da redução das propriedades antioxidantes dos pacientes de câncer em tratamento quimioterápico (KEDZIERSKA *et al.*, 2013).

Em mulheres diagnosticadas com câncer de mama, o aumento na contagem de plaquetas circulantes (trombocitose) está associado a um mal prognóstico, sugerindo um papel potencial das plaquetas na patogênese da doença. Análogo à elucidação do papel das plaquetas na inflamação, cicatrização de feridas e sepse, evidências experimentais e clínicas também sugerem que as plaquetas podem desempenhar um papel na progressão do câncer de mama (LAL, I.; DITTUS; HOLMES, 2013).

As PMPs são o tipo mais comum de MPS no sangue humano. São liberadas após a ativação fisiológica por agonistas, como a trombina ou colágeno, e são frequentemente usadas como marcador de ativação plaquetária. Plaquetas ativadas liberam exossomos (derivados de seus corpos multivesiculares intracelulares) e MPs (derivadas da membrana plasmática). Essas MPs liberadas são dotadas de propriedades pró-coagulantes pela sua capacidade

de expressar FT e fosfatidilserina (AATONEN, M. *et al.*, 2017; AATONEN, M. T. *et al.*, 2014; GOUBRAN *et al.*, 2015; TOTH *et al.*, 2008).

As PMPs possuem heterogeneidade de tamanho, podendo variar de 0,1 a 1,0 μm (100–1000nm), em contraste com exossomos que variam de ~40 a 100nm, contudo 90% das vesículas liberadas pelas plaquetas têm tamanho inferior a 500 nm, sendo a maioria na faixa de 100 a 250 nm. As PMPs expressam CD41 em sua superfície, da mesma forma que as derivadas de megacariócitos, o que permite a sua identificação por técnica de citometria de fluxo (AATONEN, M. *et al.*, 2017; AATONEN, M. T. *et al.*, 2014).

Em um estudo conduzido por Chaari *et al.* (2014), foi demonstrado que a hipercoagulabilidade sanguínea em pacientes com câncer de mama é caracterizada por aumento acentuado de PMPs pró-coagulantes, geração de trombina aumentada e degradação aumentada de fibrina. Além disso, o estágio da doença, a administração de quimioterapia e o tempo decorrido desde o diagnóstico possuem um impacto significativo, mas variável, nesses componentes (CHAARI *et al.*, 2014).

Observou-se que maiores contagens de PMPs em pacientes com câncer de mama difere conforme o tamanho do tumor. Maiores quantidades foram encontradas naqueles pacientes cujo tamanho do tumor estava entre 2,0 e 5,0 cm quando comparados aos pacientes com tumores menores que 2,0 cm. Pacientes com metástase à distância também apresentaram quantidades mais altas de PMPs (TOTH *et al.*, 2008).

1.2.4.3 Endotélio

Devido ao contato direto com o sangue, o endotélio pode ser danificado por agentes administrados por via intravenosa durante a terapia do câncer (KELTAI *et al.*, 2010). A lesão endotelial causada pela terapia tem um efeito benéfico, pois uma lesão endotelial nos vasos sanguíneos tumorais leva a uma hipóxia do tecido tumoral e conseqüentemente, a morte celular (COSSE; MICHIELS, 2008).

Em contrapartida, quando essa lesão ocorre nos tecidos não-tumorais, pode causar disfunção endotelial grave, ao exemplo do que ocorre em DCVs

secundárias ao tratamento do câncer (WOODLEY-COOK *et al.*, 2006). O endotélio é reconhecido por desempenhar um papel ativo na inibição da coagulação sanguínea em condições homeostáticas normais, e um mecanismo possível é que a exposição das células endoteliais vasculares à quimioterapia resulta na perda de seu fenótipo anticoagulante (MUKHERJEE *et al.*, 2010).

Além do estresse oxidativo, a DOXO é responsável por várias outras alterações endoteliais que podem contribuir para seus efeitos cardiovasculares prejudiciais. A exposição do endotélio da veia umbilical humana à DOXO *in vitro* resultou em uma diminuição dose e tempo dependentes nos níveis de proteína C (assim como seu mRNA correspondente), bem como no aumento de níveis de trombomodulina (proteína e seu mRNA correspondente), elevando o risco para trombose (WOODLEY-COOK *et al.*, 2006).

Utilizando um outro modelo *in vitro* com células endoteliais da veia umbilical humana, Swystun *et al.* (2009) sugeriram que as antraciclinas DOXO e epirrubicina possuem um potencial pró-trombótico, evidenciado pelo aumento da geração de trombina, em virtude de sua capacidade de alterar propriedades das células endoteliais e de monócitos, envolvendo o aumento da atividade do FT e da exposição de PS (SWYSTUN *et al.*, 2009).

As EMPs expressam em sua superfície CD31, CD34, CD51, CD54, CD146, E-selectina e endoglinina, FT, trombomodulina, EPCR (receptor da proteína C da célula endotelial), uPA (ativador do plasminogênio tipo uroquinase), uPAR (receptor de uPA), assim como as moléculas de adesão ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1), VCAM-1 (molécula de adesão vascular-1) e PECAM-1 (molécula de adesão celular endotelial plaquetária-1) e ligam-se ao vWF (LEROYER *et al.*, 2010; MUTIN; DIGNAT-GEORGE; SAMPOL, 1997).

As EMPs são capazes de ativar a coagulação sanguínea de forma direta, levando à geração de trombina, pelo fato de expressarem FT (iniciador da via extrínseca da coagulação) e de exporem PS. A expressão de moléculas de adesão permite que as EMPs transfiram moléculas bioativas, como o FT, a outros tipos de células, dessa forma, participando da disseminação de respostas pró-inflamatórias e pró-coagulantes (LEROYER *et al.*, 2010).

Em um estudo conduzido por García Garre et al. (2018), não houve diferença nas quantidades de EMPs menores que 0,1 μ m em pacientes com câncer de mama tratadas com quimioterapia neoadjuvante ou de primeira linha antes e após o tratamento. Contudo, em sua análise exploratória, a diminuição dessas MPs após a quimioterapia está associada a uma melhor sobrevida geral e possui potencial utilidade como biomarcador prognóstico relacionado à angiogênese (GARCÍA GARRE *et al.*, 2018).

Em contrapartida, Aharon et al. (2017) observaram que a contagem de EMPs é menor em indivíduos saudáveis quando comparada à pacientes com câncer de mama em terapia anti-câncer. Verificou-se que 69% das pacientes submetidas à quimioterapia neo-adjuvante e 58% submetidas à quimioterapia adjuvante apresentaram quantidade de EMPs elevados. Contudo, não houve diferença das EMPs antes e após quimioterapia (AHARON *et al.*, 2017)

É interessante ressaltar que além da relação com a homeostase, o endotélio também possui papel importante nas comorbidades que cursam com alterações cardíacas. A exemplo disso, indivíduos com IC, mas com FEVE preservada, apresentaram uma menor quantidade de EMPs, quando comparados aos indivíduos com IC com FEVE reduzida. Esses dados, combinados com os níveis elevados de NT-próBNP, apresentaram bom valor discriminatório entre insuficiência cardíaca com FEVE reduzida e preservada (BEREZIN *et al.*, 2016).

1.2.4.4 Cardiomiócitos

Os cardiomiócitos não são, de forma geral, células com perfil secretor. Contudo, são capazes de liberar VEs, cujo conteúdo pode variar significativamente dependendo do estímulo. No estresse, como acontece na hipóxia, inflamação ou lesão, os cardiomiócitos aumentam a secreção dessas vesículas. Na hipóxia por exemplo, as VEs são ricas em fatores angiogênicos (CHISTIAKOV; OREKHOV; BOBRYSEV, 2016).

Há escassez na literatura de estudos que avaliam CMPs, ou vesículas cardiomiócitos-específicas, especialmente estudos *in vivo*. E ainda estudos *in vitro* e em modelos animais não são frequentes, predominando estudo em

linhagens celulares neonatais, comparadas com as células maduras (SLUIJTER *et al.*, 2014). A liberação de VEs cardíacas pode ser promovida experimentalmente *in vitro* pelo influxo de etanol no cardiomiócito, de maneira semelhante ao que acontece mediante ao estresse oxidativo, indicando o envolvimento potencial da sinalização mediada por ROS (MALIK *et al.*, 2013).

Em um modelo *in vitro* utilizando cardiomiócitos em cultura derivados do coração de camundongos adultos, Waldenström *et al.* 2012 descreveram que as CMPs possuem um tamanho variado de 40 a 300 nm e contêm caveolina-3 e flotilina-1 em sua superfície (WALDENSTRÖM *et al.*, 2012). Em um modelo animal para infarto do miocárdio, verificou-se um aumento na liberação de MPs (252 ± 18 nm) derivadas de cardiomiócitos (fenótipo caveolina 3⁺/troponina T⁺), fibroblastos cardíacos (fenótipo CD90.2⁺) e células endoteliais (fenótipo CD31⁺/CD41⁻) (LOYER *et al.*, 2018).

As cavéolas são invaginações de 50 a 100 nm da membrana plasmática, sendo seu principal componente proteico estrutural formado pelas caveolinas. As caveolinas pertencem a uma família de três proteínas, sendo a caveonlina-1 e caveolina-2 co-expressas em uma grande variedade de tipos celulares, enquanto a caveolina-3 é uma isoforma específica do músculo, expressa principalmente em cardiomiócitos e miócitos do músculo esquelético (VOLONTE *et al.*, 2008).

Frações do plasma pobre em plaquetas (PPP) de indivíduos com cardiomiopatia dilatada idiopática foram avaliadas por cromatografia de exclusão por tamanho e depois analisadas por citometria de fluxo. Tais frações tiveram marcações caveolina-3⁺, tendo sua origem miocárdica demonstrada por meio da liberação de VEs pelos cardiomiócitos num contexto patológico (ROURA *et al.*, 2017).

1.2.5 Geração de Trombina

A trombina tem um papel multifacetado na hemostasia e representa um elo fundamental entre as respostas de coagulação primária e secundária. A trombina também tem sido associada à tumorigênese e angiogênese, com a sinalização exercida por ela sendo um dos principais contribuintes para a

disseminação metastática do tumor (BAMBACE; HOLMES, 2011). Uma vez formada, a trombina ativa os fatores V, VIII e XI, que estão envolvidos na geração de mais trombina, e ativa também o fator XIII, uma proteína envolvida na reticulação da fibrina e estabilização do coágulo. A principal função da trombina é converter o fibrinogênio solúvel em fibrina insolúvel, ao mesmo tempo em que estimula a ativação plaquetária (LEE; ANSELL, 2011).

Existe uma lacuna entre a coagulação *in vivo* e *ex vivo* quando avaliada pelo uso dos tradicionais testes de coagulação, como o TP e o TTPa. O TGT foi desenvolvido com objetivo de preencher essa lacuna e tem sido relatado como tendo fidelidade tanto com o estado de hipercoagulabilidade quanto de hipocoagulabilidade (HEMKER, H C, 2015; TRIPODI, 2016). O monitoramento contínuo da trombina foi introduzido pela primeira vez por Hemker et al. (1993), que lançou bases para o que agora é conhecido como *trombografia calibrada automatizada* (CAT), sendo a curva de geração de trombina chamada de *trombograma* (HEMKER, H C *et al.*, 1993).

Os testes de coagulação tradicionais (TP e TTPa) é dependente da concentração e atividade do fibrinogênio, em contrapartida, o TGT não sofre esse viés. Além disso, a trombina no TGT pode ser detectada mesmo após a formação do coágulo de fibrina. Além disso, o coágulo é formado nos testes TP e TTPa após apenas 5% de todo o potencial de trombina ser gerado, ou seja, 95% da trombina gerada não é avaliada pelos testes tradicionais (WU *et al.*, 2023).

Apesar dessas vantagens alguns inconvenientes sobre o TGT ainda são significativos para a implementação do teste na prática clínica. Dentre elas pode-se destacar: (i) variação significativa da medição pode ser produzida pela diferença em cada método como os substratos, a preparação da amostra, bem como as formulações matemáticas necessárias para processar os dados; (ii) o TGT utiliza o PPP ou plasma rico em plaquetas, sabe-se que componentes celulares (como leucócitos e plaquetas) participam da geração de trombina na circulação; (iii) agentes desencadeadores: a falta de padronização de reagentes desencadeadores, como a concentração de FT, dificulta a

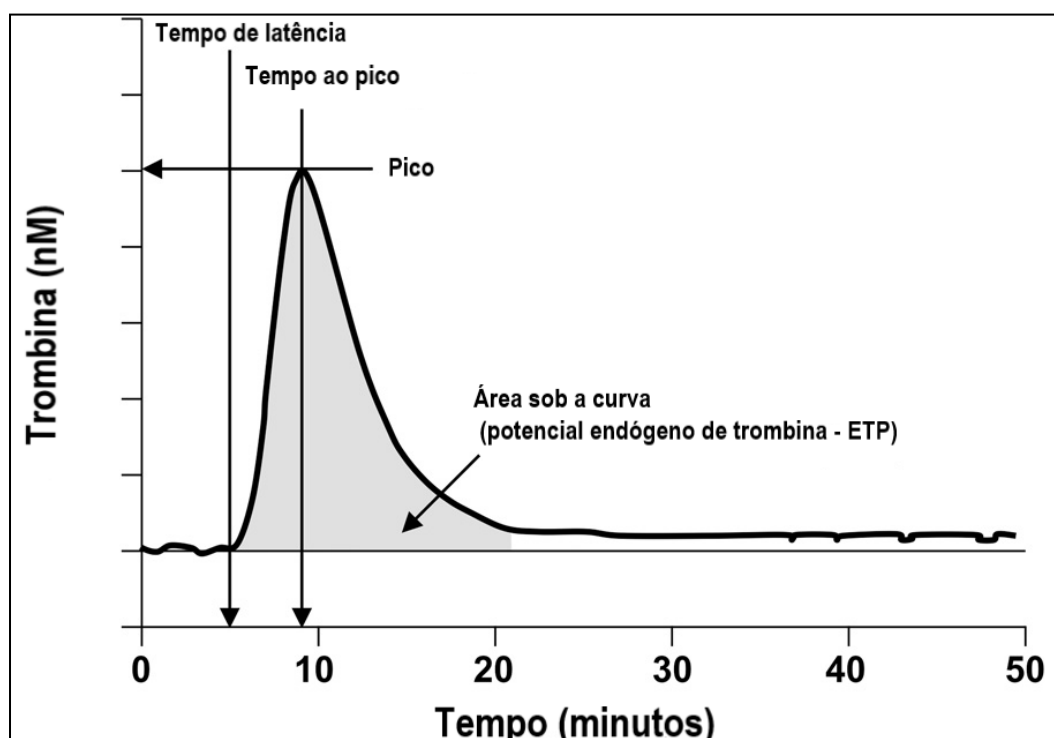
comparação entre resultados realizados entre laboratórios distintos (WU *et al.*, 2023).

O aumento da formação de trombina no plasma pode elevar o risco de trombose venosa, causado seja pela deficiência de anti-trombina, de proteína S ou de proteína C, bem como a resistência à proteína C ativada (APC), ou ainda excesso de pró-trombina. Crescentes evidências demonstram que a quantidade da atividade de trombina que se forma é um biomarcador melhor da hemostasia do que o tempo de coagulação. A quantidade de atividade de trombina formada é proporcional à concentração de trombina e ao tempo em que ela está ativada, isto é, à área sob a curva de concentração, que no trombograma, é chamado de potencial endógeno de trombina (ETP) (AL DIERI; DE LAAT; HEMKER, 2012; CAMPO *et al.*, 2012).

Atualmente, existem três métodos de ensaios de geração de trombina disponíveis comercialmente. Esses métodos ajudam a detectar os níveis de trombina gerados nas amostras dos pacientes pelo uso de substratos cromogênicos ou fluorogênicos no plasma ou no sangue total. A determinação da geração de trombina pode ajudar a indicar se os pacientes correm o risco de coagular ou sangrar (KINTIGH; MONAGLE; IGNJATOVIC, 2018).

O TGT avalia a geração de trombina (resultante do *driver* pró-coagulante) e seu decréscimo (resultante da ação do *driver* anticoagulante), avaliando o equilíbrio entre os dois. A coagulação do plasma-teste (PPP ou plasma rico em plaquetas) é ativada por pequenas quantidades de FT e fosfolípidos, e a reação da geração de trombina é então monitorada continuamente por meio de um substrato fluorogênico específico da trombina. O resultado do ensaio é uma curva (trombograma) (**Figura 4**) que descreve a variação da quantidade de trombina durante a ativação da cascata de coagulação e vários parâmetros são obtidos a partir dessa curva (**Quadro 3**) (CAMPO *et al.*, 2012; TRIPODI, 2016).

Figura 4 - Trombograma típico com parâmetros relevantes obtidos pelo Teste de Geração de Trombina pelo método CAT.



CAT: trombografia calibrada automatizada
 Fonte: TRIPODI, 2016.

Desses parâmetros, o ETP é o mais robusto, pois é determinado a partir do nível final da quantidade de produto fluorogênico que é produzido pela trombina livre. O pico é mais sensível às variações no mecanismo de geração de trombina, mas não é robusto porque deriva da primeira derivada ascendente da curva concentração-tempo (AL DIERI; DE LAAT; HEMKER, 2012).

O trombograma, resultado gráfico do TGT, reflete grande parte, senão toda, da função geral do sistema de coagulação sanguínea. Em plasma pobre em plaquetas, mostra todas as deficiências dos fatores de coagulação (com exceção do fator XIII), e é sensível à ação dos anticoagulantes orais, heparinas de todos os tipos, inibidores diretos da trombina e demais medicamentos anticoagulantes testados (HEMKER et al., 2003).

Quadro 3 - Parâmetros gerados no teste de geração de trombina (método CAT)

Parâmetro	Significado
ETP (nM x min)	Potencial de trombina endógena, corresponde a área sob a curva. Representa a quantidade total de atividade enzimática de trombina e reflete a capacidade de geração de trombina de um indivíduo.
Pico (nM)	Concentração máxima de trombina gerada
Tempo de latência (min)	Tempo entre a adição do gatilho e o início da geração de trombina. Uma medida da fase de iniciação.
Tempo ao pico (min)	Tempo transcorrido para atingir a concentração máxima de trombina gerada.
Índice de velocidade (nM/min)	Declive entre o tempo de latência e tempo ao pico.
Início da cauda (min)	Corresponde ao ponto (tempo) em que cessa a geração de trombina.

ETP: potencial endógeno de trombina. Fonte: (BAGOT; LEISHMAN, 2015).

Conforme já mencionado anteriormente, o TGT é sensível às condições de hiper e de hipocoagulabilidade. Dessa forma, o comportamento dos parâmetros gerados pelo TGT está resumido no **Quadro 4**.

Quadro 4 - Significado e interpretação dos parâmetros gerados pelo TGT.

Parâmetro	Hipocoagulabilidade	Hipercoagulabilidade
ETP	elevado	reduzido
Pico	reduzido	elevado
Tempo de latência	prolongado	reduzido
Tempo ao pico	prolongado	reduzido
Índice de velocidade	baixo	alto

ETP: potencial endógeno de trombina. Fonte: TRIPODI, 2016

Em uma coorte com 552 pacientes recém-diagnosticadas com câncer de mama de alto risco, submetidas à ressecção cirúrgica do tumor e com indicação de quimioterapia adjuvante, o TGT contribuiu para estratificar as pacientes em diferentes riscos de recidiva do câncer durante a quimioterapia. A geração de trombina foi significativamente aumentada nas pacientes que apresentaram recidivas em até dois anos pós-ressecção (MARCHETTI *et al.*, 2020).

Em estudo *in vitro* utilizando uma linhagem de carcinoma de bexiga, observou-se um maior consumo de pró-trombina e uma maior geração de trombina, principalmente nas células tratadas com DOXO, quando comparadas ao grupo controle. Os dados sugeriram que a geração de trombina ocorre por meio da via de coagulação extrínseca (dependente de FT) nas superfícies celulares e que a DOXO é capaz de regular positivamente o mRNA do FT e a expressão da proteína nessa linhagem celular (PAREDES *et al.*, 2003).

1.2.6 Relação inflamação e hemostasia

A inflamação e a coagulação constituem dois sistemas de defesa do hospedeiro com funções complementares na eliminação de patógenos invasores, limitando o dano tecidual e restaurando a homeostase (O'BRIEN, 2012). A coagulação e as vias inflamatórias estão intimamente integradas por uma extensa interface e tendem a funcionar em conjunto. Elas compreendem

diversos atores celulares e moleculares, que interagem de maneiras extremamente complexas. Um princípio básico que rege essas interações é a ativação mútua das vias. Assim, a ativação da coagulação leva à ativação concomitante de vias inflamatórias, espelhada pelo início da coagulação por vias inflamatórias (DAHLBÄCK, 2012).

Um exemplo dessa íntima interação, é o papel desempenhado pelas plaquetas. A ativação das plaquetas pela trombina ou outros agonistas resulta na liberação de múltiplos mediadores inflamatórios, incluindo quimiocinas, citocinas, peptídeos antimicrobianos, e substâncias vasoativas, todos sendo componentes importantes da resposta inflamatória. As plaquetas atuam ativamente por possuírem capacidade de interação célula-célula com neutrófilos e células endoteliais durante a hemostasia, inflamação e respostas imunes (CHOI *et al.*, 2006; DAHLBÄCK, 2012; LEVI; VAN DER POLL, 2005).

A trombina é também um regulador da inflamação por meio de sua interação com os receptores ativados por protease na superfície celular (DAHLBÄCK, 2012). Além da trombina, outro componente chave da hemostasia é o FT. A maioria das células que expressam constitutivamente o FT é encontrada em tecidos que não estão em contato direto com o sangue. No entanto, o FT entra em contato com o sangue quando ocorre a ruptura da integridade vascular, ou se as células presentes na circulação começam a expressá-lo em sua superfície. A expressão *in vivo* do FT parece ser dependente principalmente da IL-6, exemplificando mais uma relação da ativação da cascata da coagulação por atividade pró-inflamatória (LEVI; VAN DER POLL, 2005)

Crescentes evidências experimentais e clínicas sugerem que as citocinas podem contribuir significativamente para a regulação do equilíbrio hemostático em condições fisiológicas e patológicas. As citocinas são peptídeos que atuam como mediadores pleiotrópicos de inflamação e imunidade. O equilíbrio hemostático depende de interações complexas entre células endoteliais, células sanguíneas e o sistema coagulação-fibrinolítico e as citocinas desempenham um papel significativo nessas interações (GRIGNANI; MAIOLO, 2000).

As citocinas também possuem sua produção aumentada em pacientes com câncer. Citocinas como IFN- α , IFN- γ , TNF- α , IL-1 e IL-1b demonstraram ser capazes de aumentar a atividade pró-coagulante de células tumorais. As citocinas podem induzir a expressão do fator de vWF e FT em células endoteliais e monócitos. Além disso, as citocinas podem inibir a via de anti-coagulação natural da trombomodulina e proteína C. Finalmente, a estreita interação de células tumorais e células endoteliais pode induzir a expressão de FT na superfície destas últimas e esse efeito pode desempenhar um papel importante na interação bidirecional dos tumores com o sistema hemostático (DOSQUET; WEILL; WAUTIER, 1995; GRIGNANI; MAIOLO, 2000; SHAH, S. *et al.*, 2021).

Além disso, a DOXO por si só é capaz de regular positivamente a expressão de mRNA de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α . Os radicais livres gerados durante o metabolismo da DOXO resultam na ativação do estresse oxidativo, fatores pró-inflamatórios e pró-apoptóticos. O sinal inflamatório é ativado pela via do NF- κ B através da inibição de sirtuina 1 pela DOXO. O sinal inflamatório e o estresse oxidativo induzidos pelas ROS resultam na peroxidação lipídica levando ainda à apoptose (PRASANNA; RENU; VALSALA GOPALAKRISHNAN, 2020).

1.6 Trombomodulina

A trombomodulina é uma glicoproteína transmembrana codificada pelo gene THBD e é predominantemente expressa no endotélio contendo, poder ser também expressa em células imunes), músculo liso vascular queratinócitos e células epiteliais alveolares (WATANABE-KUSUNOKI *et al.*, 2020).

Atua como receptor de alta afinidade para trombina nas células endoteliais, estando dessa forma envolvida na ativação da anti-coagulação natural promovida pela via da proteína C, durante a coagulação sanguínea (GIRI *et al.*, 2021). Além das ações clássicas da trombomodulina na hemostasia, crescentes estudos tem demonstrado atividades anti-inflamatórias dessa proteína. A ação anti-inflamatória está relacionada a m dos seus cinco domínios, o domínio semelhante à lectina, que parece agir comoligante a um

receptor ainda desconhecido em células endoteliais. A trombomodulina dessa forma, age como um fator comum relação hemostasia x coagulação sanguínea (CONWAY *et al.*, 2001; MARTIN *et al.*, 2013).

Em um estudo longitudinal conduzido por Todorova *et al.* consistindo com 51 pacientes com câncer de mama, foram coletadas amostras antes do regime quimioterápico com DOXO e após o primeiro ciclo. Nesse estudo verificou-se que os níveis séricos de trombomodulina (antes e pós-quimioterapia) foram associados ao risco aumentado para cardiotoxicidade. Entretanto, nesse estudo, a cardiotoxicidade foi definida apenas com bases nos critérios de diminuição da FEVE (redução > 10%) (TODOROVA *et al.*, 2020).

Alguns autores incitam que a lesão endotelial relacionada à administração de DOXO seria um dos primeiros eventos no organismo, antes mesmo que o quimioterápico alcance outros tecidos, como o coração. Relatam também que a disfunção endotelial (evidenciada pelo aumento de trombomodulina circulante) ocorrem em decorrência da ação de ROS, como semelhantemente ocorrem em cardiomiócitos (LÓPEZ-CANDALES, 2019; MOOKADAM *et al.*, 2014).

1.3 Referências bibliográficas

- AATONEN, M. *et al.* Isolation of Platelet-Derived Extracellular Vesicles. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, v. 1545, p. 177–188, 2017.
- AATONEN, M. T. *et al.* Isolation and characterization of platelet-derived extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, v. 3, n. 1, 2014.
- AHARON, A. *et al.* Chemotherapy administration to breast cancer patients affects extracellular vesicles thrombogenicity and function. *Oncotarget*, v. 8, n. 38, p. 63265–63280, 8 set. 2017.
- AL DIERI, R.; DE LAAT, B.; HEMKER, H. C. Thrombin generation: What have we learned? *Blood Reviews*, v. 26, n. 5, p. 197–203, 2012.
- ALEXANDRU, N. *et al.* Interaction of platelets with endothelial progenitor cells in the experimental atherosclerosis: Role of transplanted endothelial progenitor cells and platelet microparticles. *Biology of the cell*, v. 107, n. 6, p. 189–204, jun. 2015.
- AL-KINDI, S. G. *et al.* Soluble CD14 and Risk of Heart Failure and Its Subtypes in Older Adults. *Journal of cardiac failure*, v. 26, n. 5, p. 410–419, maio 2020.
- ANAMPA, J.; MAKOWER, D.; SPARANO, J. A. Progress in adjuvant chemotherapy for breast cancer: An overview. *BMC Medicine*, v. 13, n. 1, p. 1–13, 2015.
- BÄCHLI, E. History of tissue factor. *British journal of haematology*, v. 110, n. 2, p. 248–255, ago. 2000.
- BAGOT, C. N.; LEISHMAN, E. Establishing a reference range for thrombin generation using a standard plasma significantly improves assay precision. *Thrombosis research*, v. 136, n. 1, p. 139–143, jul. 2015.
- BAMBACE, N. M.; HOLMES, C. E. The platelet contribution to cancer progression. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 9, n. 2, p. 237–249, 2011.
- BEREZIN, A. E. *et al.* Pattern of endothelial progenitor cells and apoptotic endothelial cell-derived microparticles in chronic heart failure patients with preserved and reduced left ventricular ejection fraction. *EBioMedicine*, v. 4, p. 86–94, 2016.
- BOUILLAUD, S.; BOUILLAUD, J. De l'Obliteration des veines et de son influence sur la formation des hydropisies partielles: consideration sur la hydropisies passive et general. *Arch Gen Med*, v. 1, n. 2, p. 188–204, 1823.
- BURGER, D. *et al.* Microparticles: Biomarkers and beyond. *Clinical Science*, v. 124, n. 7, p. 423–441, 2013.

CAIN, H. *et al.* Neoadjuvant Therapy in Early Breast Cancer: Treatment Considerations and Common Debates in Practice. *Clinical Oncology*, v. 29, n. 10, p. 642–652, 2017.

CAMPELLO, E. *et al.* Contact System Activation and Cancer: New Insights in the Pathophysiology of Cancer-Associated Thrombosis. *Thrombosis and haemostasis*, v. 118, n. 2, p. 251–265, fev. 2018.

CAMPO, G. *et al.* Thrombin generation assay: A new tool to predict and optimize clinical outcome in cardiovascular patients? *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, v. 23, n. 8, p. 680–687, 2012.

CAPPETTA, D. *et al.* Oxidative stress and cellular response to doxorubicin: A common factor in the complex milieu of anthracycline cardiotoxicity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2017, 2017.

CARDINALE, D. *et al.* Left ventricular dysfunction predicted by early troponin I release after high-dose chemotherapy. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 36, n. 2, p. 517–522, ago. 2000.

CARDINALE, D. *et al.* Myocardial injury revealed by plasma troponin I in breast cancer treated with high-dose chemotherapy. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, v. 13, n. 5, p. 710–715, maio 2002.

CARDINALE, DANIELA *et al.* Anthracycline-induced cardiomyopathy: clinical relevance and response to pharmacologic therapy. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 55, n. 3, p. 213–220, jan. 2010.

CARDINALE, DANIELA *et al.* Prevention of high-dose chemotherapy-induced cardiotoxicity in high-risk patients by angiotensin-converting enzyme inhibition. *Circulation*, v. 114, n. 23, p. 2474–2481, dez. 2006.

CARDINALE, DANIELA *et al.* Prognostic value of troponin I in cardiac risk stratification of cancer patients undergoing high-dose chemotherapy. *Circulation*, v. 109, n. 22, p. 2749–2754, jun. 2004.

CHAARI, M. *et al.* Impact of breast cancer stage, time from diagnosis and chemotherapy on plasma and cellular biomarkers of hypercoagulability. *BMC Cancer*, v. 14, n. 1, p. 991, 22 dez. 2014.

CHAUDRY, M.; BANCHS, J.; CHAVEZ-MACGREGOR, M. Anthracycline or trastuzumab-related cardiotoxicity: do we have a predictive biomarker? *Biomarkers in medicine*, v. 10, n. 3, p. 315–328, 2016.

CHISTIYAKOV, D. A.; OREKHOV, A. N.; BOBRYSHEV, Y. V. Cardiac Extracellular Vesicles in Normal and Infarcted Heart. *International journal of molecular sciences*, v. 17, n. 1, jan. 2016.

CHOI, G. *et al.* The relationship between inflammation and the coagulation system. *Swiss medical weekly*, v. 136, n. 9–10, p. 139–144, mar. 2006.

CHUNG, R. *et al.* Effect of Remote Ischaemic Conditioning in Oncology Patients Undergoing Chemotherapy: Rationale and Design of the ERIC-ONC Study--A Single-Center, Blinded, Randomized Controlled Trial. *Clinical cardiology*, v. 39, n. 2, p. 72–82, fev. 2016.

COCUCCI, E.; MELDOLESI, J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends in cell biology*, v. 25, n. 6, p. 364–372, jun. 2015.

CONNOR, D. E. *et al.* The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib. *Thrombosis and haemostasis*, v. 103, n. 5, p. 1044–1052, maio 2010.

CONWAY, E. M. *et al.* The lectin-like domain of thrombomodulin confers protection from neutrophil-mediated tissue damage by suppressing adhesion molecule expression via nuclear factor kappaB and mitogen-activated protein kinase pathways. *The Journal of experimental medicine*, v. 196, n. 5, p. 565–577, set. 2002.

COSSE, J.-P.; MICHIELS, C. Tumour hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, v. 8, n. 7, p. 790–797, out. 2008.

COUGHLIN, S. S. Epidemiology of Breast Cancer in Women. In: AHMAD, A. (Org.). *Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance: Challenges and Progress*. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 9–29.

CRANENBURG, E. C. M. *et al.* The Circulating Inactive Form of Matrix Gla Protein (ucMGP) as a Biomarker for Cardiovascular Calcification. *Journal of Vascular Research*, v. 45, n. 5, p. 427–436, 2008.

CRESPIN, M. *et al.* Activation of PAK1/2 during the shedding of platelet microvesicles. *Blood coagulation & fibrinolysis: an international journal in haemostasis and thrombosis*, v. 20, n. 1, p. 63–70, jan. 2009.

DAHLBÄCK, B. Coagulation and inflammation—close allies in health and disease. *Seminars in Immunopathology*, v. 34, n. 1, p. 1–3, 5 jan. 2012.

DAI, X. *et al.* Cancer hallmarks, biomarkers and breast cancer molecular subtypes. *Journal of Cancer*, v. 7, n. 10, p. 1281–1294, 2016.

DOSQUET, C.; WEILL, D.; WAUTIER, J. L. Cytokines and thrombosis. *Journal of cardiovascular pharmacology*, v. 25 Suppl 2, p. S13-9, 1995.

DUFFY, M. J.; O'DONOVAN, N.; CROWN, J. Use of molecular markers for predicting therapy response in cancer patients. *Cancer treatment reviews*, v. 37, n. 2, p. 151–159, abr. 2011.

EBCTCG: EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: Meta-analyses of long-term outcome among 100 000 women in 123

randomised trials. *The Lancet*, v. 379, n. 9814, p. 432–444, 2012.

EILERTSEN, K.-E.; ØSTERUD, B. Tissue factor: (patho)physiology and cellular biology. *Blood coagulation & fibrinolysis: an international journal in haemostasis and thrombosis*, v. 15, n. 7, p. 521–538, out. 2004.

EMMERSON, P. J. et al. GDF15 and Growth Control. *Frontiers in physiology*, v. 9, p. 1712, 2018.

FALANGA, A; RUSSO, L. Epidemiology, risk and outcomes of venous thromboembolism in cancer. *Hamostaseologie*, v. 32, n. 2, p. 115–125, 2012.

FALANGA, ANNA et al. Mechanisms and risk factors of thrombosis in cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 118, n. June, p. 79–83, out. 2017.

FATHIL, M. F. M. et al. Diagnostics on acute myocardial infarction: Cardiac troponin biomarkers. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 70, p. 209–220, ago. 2015.

FRANCO, Y. L.; VAIDYA, T. R.; AIT-OU DHIA, S. Anticancer and cardio-protective effects of liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, v. 10, p. 131–141, 2018.

FURUHASHI, M. Fatty Acid-Binding Protein 4 in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, v. 26, n. 3, p. 216–232, mar. 2019.

GARCÍA GARRE, E. et al. Circulating small-sized endothelial microparticles as predictors of clinical outcome after chemotherapy for breast cancer: an exploratory analysis. *Breast cancer research and treatment*, v. 169, n. 1, p. 83–92, maio 2018.

GARDINER, C. et al. Extracellular vesicles, tissue factor, cancer and thrombosis - discussion themes of the ISEV 2014 educational day. *Journal of Extracellular Vesicles*, v. 4, n. 2015, p. 1–14, 2015.

GARNIER, D. et al. Genetic pathways linking hemostasis and cancer. *Thrombosis research*, v. 129 Suppl, p. S22-9, abr. 2012.

GHELDOLF, D. et al. Thrombin generation assay and transmission electron microscopy: a useful combination to study tissue factor-bearing microvesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, v. 2, n. 1, p. 19728, 1 jan. 2013.

GIRI, H. et al. Thrombomodulin is essential for maintaining quiescence in vascular endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 118, n. 11, mar. 2021.

GOUBRAN, H. et al. Platelet microparticles and cancer: An intimate cross-talk. *Transfusion and Apheresis Science*, v. 53, n. 2, p. 168–172, 2015.

GRIGNANI, G.; MAIOLO, A. Cytokines and hemostasis. *Haematologica*, v. 85, n. 9, p. 967–972, set. 2000.

HAJJAR, LUDHMILA ABRAHÃ\POUNDSO *et al.* Diretriz Brasileira de Cardio-oncologia – 2020. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 115, p. 1006–1043, 2020.

HAJJAR, LUDHMILA ABRAHÃO *et al.* Diretriz Brasileira de Cardio-oncologia – 2020. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 115, n. 5, p. 1006–1043, 2020.

HARBECK, N.; GNANT, M. Breast cancer. *The Lancet*, v. 389, n. 10074, p. 1134–1150, mar. 2017.

HEMKER, H C *et al.* Continuous registration of thrombin generation in plasma, its use for the determination of the thrombin potential. *Thrombosis and haemostasis*, v. 70, n. 4, p. 617–624, out. 1993.

HEMKER, H C. The application of thrombin generation in real life clinical situations. *Thrombosis research*, v. 136, n. 1, p. 3–4, jul. 2015.

HEMKER, H COENRAAD *et al.* Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiology of haemostasis and thrombosis*, v. 33, n. 1, p. 4–15, 2003.

HENRIKSEN, P. A. Anthracycline cardiotoxicity: an update on mechanisms, monitoring and prevention. *Heart (British Cardiac Society)*, v. 104, n. 12, p. 971–977, jun. 2018.

HISADA, Y.; MACKMAN, N. Cancer-associated pathways and biomarkers of venous thrombosis. *Blood*, v. 130, n. 13, p. 1499–1506, set. 2017.

HORSTED, F.; WEST, J.; GRAINGE, M. J. Risk of venous thromboembolism in patients with cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS medicine*, v. 9, n. 7, p. e1001275, 2012.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ DE ALENCAR GOMES DA SILVA. *Estimativa/2020 – Incidência de Câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: [s.n.], 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. *Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA, 2019.

JASRA, S.; ANAMPA, J. Anthracycline Use for Early Stage Breast Cancer in the Modern Era: a Review. *Current Treatment Options in Oncology*, v. 19, n. 6, 2018.

JEPPESEN, D. K. *et al.* Reassessment of Exosome Composition. *Cell*, v. 177, n. 2, p. 428- 445.e18, 2019.

JURASZ, P.; ALONSO-ESCOLANO, D.; RADOMSKI, M. W. Platelet-cancer interactions: Mechanisms and pharmacology of tumour cell-induced platelet aggregation. *British Journal of Pharmacology*, v. 143, n. 7, p. 819–826, 2004.

KEDZIERSKA, M. *et al.* The changes of blood platelet activation in breast cancer patients before surgery, after surgery, and in various phases of the

chemotherapy. *Platelets*, v. 24, n. 6, p. 462–468, 2013.

KELTAI, K. *et al.* Doxorubicin selectively suppresses mRNA expression and production of endothelin-1 in endothelial cells. *Vascular Pharmacology*, v. 53, n. 5–6, p. 209–214, 2010.

KHAN, U. T. *et al.* Venous thromboembolism and mortality in breast cancer: cohort study with systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*, v. 17, n. 1, p. 747, 10 dez. 2017.

KHORANA, A. A. *et al.* Incidence and predictors of venous thromboembolism (VTE) among ambulatory high-risk cancer patients undergoing chemotherapy in the United States. *Cancer*, v. 119, n. 3, p. 648–655, fev. 2013.

KINTIGH, J.; MONAGLE, P.; IGNJATOVIC, V. A review of commercially available thrombin generation assays. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*, v. 2, n. 1, p. 42–48, 2018.

KIRKHAM, A. A. *et al.* Cardiac and cardiometabolic phenotyping of trastuzumab-mediated cardiotoxicity: a secondary analysis of the MANTICORE trial. *European heart journal. Cardiovascular pharmacotherapy*, v. 8, n. 2, p. 130–139, fev. 2022.

KOIZUME, S. *et al.* Activation of cancer cell migration and invasion by ectopic synthesis of coagulation factor VII. *Cancer research*, v. 66, n. 19, p. 9453–9460, out. 2006.

KOLEINI, N.; KARDAMI, E. Autophagy and mitophagy in the context of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Oncotarget*, v. 8, n. 28, p. 46663–46680, 11 jul. 2017.

KONIGSBERG, W. *et al.* The TF:VIIa complex: clinical significance, structure-function relationships and its role in signaling and metastasis. *Thrombosis and haemostasis*, v. 86, n. 3, p. 757–771, set. 2001.

LACROIX, R. *et al.* Microvesicles and Cancer Associated Thrombosis. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, v. 45, n. 6, p. 593–603, set. 2019.

LAL, I.; DITTUS, K.; HOLMES, C. E. Platelets, coagulation and fibrinolysis in breast cancer progression. *Breast cancer research : BCR*, v. 15, n. 4, p. 207, 2013.

LAL, S. *et al.* Molecular signatures in breast cancer. *Methods*, v. 131, p. 135–146, 2017.

LANNIGAN, J.; ERDBRUEGGER, U. Imaging flow cytometry for the characterization of extracellular vesicles. *Methods*, v. 112, p. 55–67, 2017.

LAWSON, C. *et al.* Microvesicles and exosomes: new players in metabolic and cardiovascular disease. *The Journal of endocrinology*, v. 228, n. 2, p. R57–71, fev. 2016.

LEE, C. J.; ANSELL, J. E. Direct thrombin inhibitors. *British journal of clinical pharmacology*, v. 72, n. 4, p. 581–592, out. 2011.

LENIHAN, D. J. *et al.* The Utility of Point-of-Care Biomarkers to Detect Cardiotoxicity During Anthracycline Chemotherapy: A Feasibility Study. *Journal of cardiac failure*, v. 22, n. 6, p. 433–438, jun. 2016.

LEROYER, A. S. *et al.* Endothelial-derived microparticles: Biological conveyors at the crossroad of inflammation, thrombosis and angiogenesis. *Thrombosis and haemostasis*, v. 104, n. 3, p. 456–463, set. 2010.

LEVI, M.; VAN DER POLL, T. Two-way interactions between inflammation and coagulation. *Trends in cardiovascular medicine*, v. 15, n. 7, p. 254–259, out. 2005.

LEVIS, B. E.; BINKLEY, P. F.; SHAPIRO, C. L. Cardiotoxic effects of anthracycline-based therapy: what is the evidence and what are the potential harms? *The Lancet Oncology*, v. 18, n. 8, p. e445–e456, 2017.

LI, B. *et al.* RhoA triggers a specific signaling pathway that generates transforming microvesicles in cancer cells. *Oncogene*, v. 31, n. 45, p. 4740–4749, 2012.

LÓPEZ-CANDALES, A. Cardio-oncology: in search of the right balance. *Postgraduate Medicine*, v. 131, n. 2, p. 79–81, 17 fev. 2019.

LOYER, X. *et al.* Intra-Cardiac Release of Extracellular Vesicles Shapes Inflammation Following Myocardial Infarction. *Circulation Research*, v. 123, n. 1, p. 100–106, 2018.

ŁUKASIEWICZ, S. *et al.* Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies—An Updated Review. *Cancers*, v. 13, n. 17, p. 4287, 25 ago. 2021.

MACKMAN, N.; TILLEY, R. E.; KEY, N. S. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, v. 27, n. 8, p. 1687–1693, ago. 2007.

MAGNUS, N. *et al.* Oncogenes and the coagulation system - Forces that modulate dormant and aggressive states in cancer. *Thrombosis Research*, v. 133, n. SUPPL. 2, p. S1–S9, 2014.

MALIK, Z. A. *et al.* Cardiac myocyte exosomes: stability, HSP60, and proteomics. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, v. 304, n. 7, p. H954-65, abr. 2013.

MANTARRO, S. *et al.* Risk of severe cardiotoxicity following treatment with trastuzumab: a meta-analysis of randomized and cohort studies of 29,000 women with breast cancer. *Internal and emergency medicine*, v. 11, n. 1, p. 123–140, fev. 2016.

MARCHETTI, M. *et al.* Thrombin generation predicts for early recurrence in

breast cancer patients. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, p. 0–2, 2020.

MARTIN, F. A.; MURPHY, R. P.; CUMMINS, P. M. Thrombomodulin and the vascular endothelium: insights into functional, regulatory, and therapeutic aspects. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, v. 304, n. 12, p. H1585-97, jun. 2013.

MAUGHAN, K. L.; LUTTERBIE, M. A.; HAM, P. S. Treatment of breast cancer. *American family physician*, v. 81, n. 11, p. 1339–1346, jun. 2010.

MAY, B. M. *et al.* GDF-15 as a Biomarker in Cardiovascular Disease. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, v. 116, n. 3, p. 494–500, mar. 2021.

MAYER, O. J. *et al.* Desphospho-uncarboxylated matrix Gla-protein is associated with mortality risk in patients with chronic stable vascular disease. *Atherosclerosis*, v. 235, n. 1, p. 162–168, jul. 2014.

MCDONALD, E. S. *et al.* Clinical Diagnosis and Management of Breast Cancer. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, v. 57 Suppl 1, p. 9S-16S, fev. 2016.

MCGOWAN, J. V. *et al.* Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, v. 31, n. 1, p. 63–75, 9 fev. 2017.

MÉDIONI, J.; GUASTALLA, J.; DROUET, L. Thrombose veineuse et cancer du sein. *Bulletin du Cancer*, v. 99, n. 2, p. 199–210, fev. 2012.

MEHTA, L. S. *et al.* Cardiovascular Disease and Breast Cancer: Where These Entities Intersect: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*, v. 137, n. 8, p. e30–e66, 2018.

MI, X.-K. *et al.* Mechanism of the high coagulation state of breast cancer tissue factor. *European review for medical and pharmacological sciences*, v. 21, n. 9, p. 2167–2171, maio 2017.

MINCIACCHI, V. R.; FREEMAN, M. R.; DI VIZIO, D. Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. *Seminars in cell & developmental biology*, v. 40, p. 41–51, abr. 2015.

MINOTTI, G. *et al.* Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*, v. 56, n. 2, p. 185–229, jun. 2004.

MION, M. M. *et al.* Analytical and clinical performance of a fully automated cardiac multi-markers strategy based on protein biochip microarray technology. *Clinical Biochemistry*, v. 40, n. 16, p. 1245–1251, 2007.

MOOKADAM, F. *et al.* Intersection of cardiology and oncology clinical practices. *Frontiers in oncology*, v. 4, p. 259, 2014.

MUKHERJEE, S. D. *et al.* Impact of chemotherapy on thrombin generation and on the protein C pathway in breast cancer patients. *Pathophysiology of*

haemostasis and thrombosis, v. 37, n. 2–4, p. 88–97, 2010.

MUTIN, M.; DIGNAT-GEORGE, F.; SAMPOL, J. Immunologic phenotype of cultured endothelial cells: quantitative analysis of cell surface molecules. *Tissue antigens*, v. 50, n. 5, p. 449–458, nov. 1997.

O'BRIEN, M. The reciprocal relationship between inflammation and coagulation. *Topics in companion animal medicine*, v. 27, n. 2, p. 46–52, maio 2012.

OWENS, A. P. 3RD; MACKMAN, N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circulation research*, v. 108, n. 10, p. 1284–1297, maio 2011.

PAREDES, N. *et al.* The effects of chemotherapeutic agents on the regulation of thrombin on cell surfaces. *British Journal of Haematology*, v. 120, n. 2, p. 315–324, jan. 2003.

PAREEK, N. *et al.* Activity and outcomes of a cardio-oncology service in the United Kingdom—a five-year experience. *European Journal of Heart Failure*, v. 20, n. 12, p. 1721–1731, 2018.

PATNAIK, J. L. *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*, v. 13, n. 3, p. R64, 20 jun. 2011.

PEGTEL, D. M.; GOULD, S. J. Exosomes. *Annual review of biochemistry*, v. 88, p. 487–514, jun. 2019.

PICHON, M. F. *et al.* Drug-induced cardiotoxicity studied by longitudinal B-type natriuretic peptide assays and radionuclide ventriculography. *In vivo (Athens, Greece)*, v. 19, n. 3, p. 567–576, 2005.

PRASANNA, P. L.; RENU, K.; VALSALA GOPALAKRISHNAN, A. New molecular and biochemical insights of doxorubicin-induced hepatotoxicity. *Life Sciences*, v. 250, p. 117599, 2020.

PRENTICE, K. J.; SAKSI, J.; HOTAMISLIGIL, G. S. Adipokine FABP4 integrates energy stores and counterregulatory metabolic responses. *Journal of lipid research*, v. 60, n. 4, p. 734–740, abr. 2019.

PUDDU, P. *et al.* The involvement of circulating microparticles in inflammation, coagulation and cardiovascular diseases. *Canadian Journal of Cardiology*, v. 26, n. 4, p. e140–e145, 2010.

PUDIL, R. *et al.* Role of serum biomarkers in cancer patients receiving cardiotoxic cancer therapies: a position statement from the Cardio-Oncology Study Group of the Heart Failure Association and the Cardio-Oncology Council of the European Society of Cardiology. *European journal of heart failure*, v. 22, n. 11, p. 1966–1983, nov. 2020.

PUTT, M. *et al.* Longitudinal Changes in Multiple Biomarkers Are Associated with Cardiotoxicity in Breast Cancer Patients Treated with Doxorubicin,

Taxanes, and Trastuzumab. *Clinical chemistry*, v. 61, n. 9, p. 1164–1172, set. 2015.

RAKHA, E. A.; REIS-FILHO, J. S.; ELLIS, I. O. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 120, n. 2, p. 293–308, 2010.

REBOUCAS, D. S. *et al.* Thromboembolic events in breast cancer patients: A large series. *Journal of Clinical Oncology*, v. 31, n. 15_suppl, p. 9589, 20 maio 2013.

RICKLES, F. R.; FALANGA, A. Molecular basis for the relationship between thrombosis and cancer. *Thrombosis Research*, v. 102, n. 6, p. 215–224, 2001.

ROJAS, K.; STUCKEY, A. Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, v. 59, n. 4, p. 651–672, 2016.

ROURA, S. *et al.* Extracellular vesicles do not contribute to higher circulating levels of soluble LRP1 in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Journal of cellular and molecular medicine*, v. 21, n. 11, p. 3000–3009, nov. 2017.

RULLMAN, E. *et al.* Circulatory factors associated with function and prognosis in patients with severe heart failure. *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society*, v. 109, n. 6, p. 655–672, jun. 2020.

RUSSELL, A. E. *et al.* Biological membranes in EV biogenesis , stability , uptake , and cargo transfer : an ISEV position paper arising from the ISEV membranes and EVs workshop. *Journal of Extracellular Vesicles*, v. 8, n. 1, 2019.

SANCHO-GARNIER, H.; COLONNA, M. Breast cancer epidemiology. *Presse Medicale*, v. 48, n. 10, p. 1076–1084, 2019.

SANDRI, M. T. *et al.* N-terminal pro-B-type natriuretic peptide after high-dose chemotherapy: a marker predictive of cardiac dysfunction? *Clinical chemistry*, v. 51, n. 8, p. 1405–1410, ago. 2005.

SHAH, A. N.; GRADISHAR, W. J. Adjuvant Anthracyclines in Breast Cancer: What Is Their Role? *The Oncologist*, v. 23, n. 10, p. 1153–1161, 2018.

SHAH, S. *et al.* Cancer-Associated Thrombosis: A New Light on an Old Story. *Diseases*, v. 9, n. 2, p. 34, 2021.

SIEGEL, R. L. *et al.* Cancer statistics, 2022. *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 72, n. 1, p. 7–33, jan. 2022.

SILVA, E. F. *et al.* DNA-doxorubicin interaction: New insights and peculiarities. *Biopolymers*, v. 107, n. 3, p. 1–9, 2017.

SIMÕES, R. *et al.* Identification of Clinical and Laboratory Variables Associated with Cardiotoxicity Events Due to Doxorubicin in Breast Cancer Patients: A 1-Year Follow-Up Study. *Cardiovascular Toxicology*, v. 21, n. 2, p. 106–114, 25

fev. 2021.

SJÖBERG, E. *et al.* The diverse and complex roles of atypical chemokine receptors in cancer: From molecular biology to clinical relevance and therapy. *Advances in cancer research*, v. 145, p. 99–138, 2020.

SKEATE, J. G. *et al.* TNFSF14: LIGHTing the Way for Effective Cancer Immunotherapy. *Frontiers in immunology*, v. 11, p. 922, 15 maio 2020.

SLUIJTER, J. P. G. *et al.* Microvesicles and exosomes for intracardiac communication. *Cardiovascular research*, v. 102, n. 2, p. 302–311, maio 2014.

SMITH, L. A. *et al.* Cardiotoxicity of anthracycline agents for the treatment of cancer: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMC cancer*, v. 10, p. 337, jun. 2010.

SOMAJO, S. *et al.* Protein S and factor v in regulation of coagulation on platelet microparticles by activated protein C. *Thrombosis Research*, v. 134, n. 1, p. 144–152, 2014.

SPYROPOULOS, A. C. *et al.* External Validation of a Venous Thromboembolic Risk Score for Cancer Outpatients with Solid Tumors: The COMPASS-CAT Venous Thromboembolism Risk Assessment Model. *The Oncologist*, v. 25, n. 7, 2020.

SUNG, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 71, n. 3, p. 209–249, maio 2021.

SWAIN, S. M.; WHALEY, F. S.; EWER, M. S. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: A retrospective analysis of three trials. *Cancer*, v. 97, n. 11, p. 2869–2879, 2003.

SWYSTUN, L. L. *et al.* Chemotherapeutic agents doxorubicin and epirubicin induce a procoagulant phenotype on endothelial cells and blood monocytes. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 7, n. 4, p. 619–626, 2009.

SWYSTUN, L. L.; MUKHERJEE, S.; LIAW, P. C. Breast cancer chemotherapy induces the release of cell-free DNA, a novel procoagulant stimulus. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 9, n. 11, p. 2313–2321, 2011.

SZATANEK, R. *et al.* The methods of choice for extracellular vesicles (EVs) characterization. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 6, 2017.

TACAR, O.; SRIAMORNSAK, P.; DASS, C. R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, v. 65, n. 2, p. 157–170, fev. 2013.

TAO, Z. Q. *et al.* Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. *Cell Biochemistry and Biophysics*, v. 72, n. 2, p. 333–338, 2015.

THÉRY, C. *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018

(MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of extracellular vesicles*, v. 7, n. 1, p. 1535750, 2018.

THUMSER, A. E.; MOORE, J. B.; PLANT, N. J. Fatty acid binding proteins: tissue-specific functions in health and disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, v. 17, n. 2, 2014.

TIMP, J. F. *et al.* Epidemiology of cancer-associated venous thrombosis. *Blood*, v. 122, n. 10, p. 1712–1723, set. 2013.

TODOROVA, V. K. *et al.* Biomarkers of inflammation, hypercoagulability and endothelial injury predict early asymptomatic doxorubicin-induced cardiotoxicity in breast cancer patients. *American journal of cancer research*, v. 10, n. 9, p. 2933–2945, 2020.

TOTH, B. *et al.* Platelet-derived microparticles and coagulation activation in breast cancer patients. *Thrombosis and haemostasis*, v. 100, n. 4, p. 663–669, out. 2008.

TRIPODI, A. Thrombin generation assay and its application in the clinical laboratory. *Clinical Chemistry*, v. 62, n. 5, p. 699–707, 2016.

TROUSSEAU, A. Phlegmatia alba dolens. *Clinique Médicale de L'hôtel-dieu de Paris*. 2. ed. Paris: J-B Baillière et fils, 1865. p. 654–712.

VAN DER POL, E. *et al.* Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 8, n. 12, p. 2596–2607, 2010.

VOLONTE, D. *et al.* Caveolin-1 and caveolin-3 form heterooligomeric complexes in atrial cardiac myocytes that are required for doxorubicin-induced apoptosis. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, v. 294, n. 1, p. 392–401, 2008.

VOUKALIS, C.; SHANTSILA, E.; LIP, G. Y. H. Microparticles and cardiovascular diseases. *Annals of medicine*, v. 51, n. 3–4, p. 193–223, 2019.

WAKS, A. G.; WINER, E. P. Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, v. 321, n. 3, p. 288–300, 2019.

WALDENSTRÖM, A. *et al.* Cardiomyocyte microvesicles contain DNA/RNA and convey biological messages to target cells. *PloS one*, v. 7, n. 4, p. e34653, 2012.

WANG, T. J. *et al.* Natural history of asymptomatic left ventricular systolic dysfunction in the community. *Circulation*, v. 108, n. 8, p. 977–982, ago. 2003.

WARD-KAVANAGH, L. K. *et al.* The TNF Receptor Superfamily in Co-stimulating and Co-inhibitory Responses. *Immunity*, v. 44, n. 5, p. 1005–1019, maio 2016.

- WATANABE-KUSUNOKI, K. *et al.* Thrombomodulin as a Physiological Modulator of Intravascular Injury. *Frontiers in immunology*, v. 11, p. 575890, 2020.
- WENDT, C.; MARGOLIN, S. Identifying breast cancer susceptibility genes - a review of the genetic background in familial breast cancer. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*, v. 58, n. 2, p. 135–146, fev. 2019.
- WINTERS, S. *et al.* Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. [S.l.]: Elsevier Inc., 2017. v. 151. p. 1–32.
- WITTELES, R. M. Biomarkers as Predictors of Cardiac Toxicity From Targeted Cancer Therapies. *Journal of Cardiac Failure*, v. 22, n. 6, p. 459–464, 2016.
- WOJTUKIEWICZ, M. Z. *et al.* The hemostatic system and angiogenesis in malignancy. *Neoplasia*, v. 3, n. 5, p. 371–384, 2001.
- WOODLEY-COOK, J. *et al.* Effects of the chemotherapeutic agent doxorubicin on the protein C anticoagulant pathway. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 5, n. 12, p. 3303–3311, 2006.
- WRIGHT, S. D. *et al.* CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science (New York, N.Y.)*, v. 249, n. 4975, p. 1431–1433, set. 1990.
- WU, Y.; LU, Y.; ZHANG, J. Thrombin generation assay: the present and the future. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, v. 34, n. 1, p. 1–7, 2023.
- YÁÑEZ-MÓ, M. *et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of extracellular vesicles*, v. 4, p. 27066, 2015.
- YU, J. L. *et al.* Modulation of the oncogene-dependent tissue factor expression by kinase suppressor of ras 1. *Thrombosis research*, v. 126, n. 1, p. e6-10, jul. 2010.
- ZABOROWSKI, M. P. *et al.* Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *Bioscience*, v. 65, n. 8, p. 783–797, ago. 2015.
- ZAMORANO, J. L. *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 (E. *European heart journal*, v. 37, n. 36, p. 2768–2801, set. 2016.
- ZHEN, E. Y. *et al.* Quantification of heart fatty acid binding protein as a biomarker for drug-induced cardiac and musculoskeletal necroses. *PROTEOMICS – Clinical Applications*, v. 1, n. 7, p. 661–671, 1 jul. 2007.
- ZHU, C. *et al.* Recent advances of aptasensors for exosomes detection. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 160, n. April, p. 112213, 2020.

ZOMER, A. *et al.* Exosomes: Fit to deliver small RNA. *Communicative & integrative biology*, v. 3, n. 5, p. 447–450, set. 2010.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliação longitudinal da cardiotoxicidade secundária à quimioterapia à base de doxorrubicina em pacientes com câncer de mama e sua relação com marcadores hemostáticos, cardiovasculares, micropartículas e inflamatórios.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar um estudo longitudinal avaliando os parâmetros derivados do teste de geração de trombina em pacientes com e sem cardiotoxicidade pelo uso de doxorrubicina;
- Avaliar escore de risco de tromboembolismo venoso e a sua relação com citocinas, antes do primeiro ciclo quimioterapia com doxorrubicina;
- Avaliar novos marcadores cardiovasculares após a quimioterapia com doxorrubicina, comparado a um grupo controle;
- Realizar um estudo longitudinal avaliando as micropartículas derivadas de cardiomiócitos, células endoteliais, plaquetas e que expressam fator tissular em pacientes com e sem cardiotoxicidade pelo uso de doxorrubicina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP), sob número 38538714.20000.5149 e Comitê de Ética da FHEMIG (n. 54376216.0.0000.5119) (**ANEXOS I e II**).

As participantes que aceitaram participar da pesquisa, por meio de manifestação expressa, livre e esclarecida, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) estando cientes das condições e propósitos do projeto, inclusive dos riscos. Não houve prejuízo do seguimento terapêutico e demais tratamentos naquelas pacientes que se recusaram ou decidiram interromper sua participação no estudo.

3.2 Caracterização do estudo

Trata-se de um estudo longitudinal prospectivo em pacientes diagnosticadas com câncer de mama, atendidas ambulatorialmente no Hospital Alberto Cavalcanti (HAC) da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG), localizado em Belo Horizonte – MG, no período de junho de 2015 a junho de 2018. Em uma abordagem secundário, realizou-se um estudo transversal caso-controle.

Este estudo faz parte de um projeto maior intitulado “Avaliação de marcadores bioquímicos e determinação de miRNAs relacionados ao sistema renina-angiotensina associados à eventos cardiovasculares secundários ao uso de quimioterápico DOXO em pacientes portadoras de câncer de mama” coordenado pela Profa. Karina Braga.

3.3 Tamanho amostral

O cálculo amostral baseou-se na utilização de dados epidemiológicos sobre a cardiotoxicidade em mulheres sob o uso de antraciclinas. Obteve-se uma estimativa de 75 mulheres com câncer de mama e mais 20% (considerando a eventual perda de seguimento de pacientes no estudo), o que somou um tamanho amostral de 90 indivíduos.

3.4 Critérios de inclusão

Foram consideradas elegíveis as pacientes que assinaram o TCLE e que atendiam aos critérios:

- Idade igual ou superior a 18 anos;
- Diagnóstico de câncer de mama por exame histopatológico;
- Com indicação de quimioterapia neoadjuvante com doxorrubicina.

3.5 Critérios de não-inclusão

- Expectativa de vida menor que 3 meses;
- Histórico de quimioterapia ou radioterapia prévio ao início do estudo;
- Disfunção ventricular esquerda (FEVE < 50%) prévia à quimioterapia e ao início do estudo;
- Histórico de doença cardíaca, ou sinais de descompensação, como: infarto do miocárdio, ICC, *angina pectoris*, arritmias com uso de medicação, doença valvar clinicamente significativa, hipertensão arterial não controlada;
- Disfunção hepática moderada a grave;
- Disfunção renal moderada a grave;
- Doenças neuro-degenerativas;
- Gestantes;
- Uso de anti-coagulantes ou anti-agregantes plaquetários.

3.6 Coleta de dados

A seleção, anamnese e coleta das amostras biológicas foram realizadas durante o trabalho de tese de doutorado de Ricardo Simões, sob o título “Avaliação de marcadores bioquímicos associados a eventos cardiovasculares secundários ao uso de doxorrubicina em pacientes com câncer de mama”, defendido pelo Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG em 2019.

Após a avaliação de elegibilidade das pacientes para o estudo e de seu consentimento na participação do mesmo, as pacientes foram submetidas à uma avaliação inicial, quando foram coletadas informações clínicas e

demográficas, e encaminhadas para seguimento no ambulatório de oncologia do HAC.

O estudo longitudinal foi cronologicamente dividido em três tempos;

1. T0: Avaliação inicial, prévio à quimioterapia com DOXO;
2. T1: Após o último ciclo de quimioterapia com DOXO, até 7 dias de finalizado o tratamento;
Ambulatorialmente, as pacientes foram acompanhadas após três e seis meses.
3. T2: Doze meses após o término da quimioterapia com DOXO;

Dados clínicos (idade, índice de massa corporal, diagnóstico de hipertensão e/ou diabetes mellitus, arritmias, distúrbios da tireoide, idade da menarca, estado da menopausa, idade da menopausa, etilismo e tabagismo) foram coletados em T0.

As coletas de dados foram realizadas no período de junho de 2015 a junho de 2018.

3.6.1 Medição da FEVE

A medição da FEVE foi feita por meio de exame ecocardiográfico, que compreendeu um estudo bidimensional com Doppler colorido padrão, incluindo modo tecidual com ecocardiógrafo *Vivid S6* (GE Medical Systems Heathcare®, Tirat Carmel, Israel). A função sistólica do ventrículo esquerdo foi avaliada pelo método biplano de Simpson para o cálculo dos volumes ventriculares e da FEVE, obtido em duas e quatro câmaras. Todo exame ecocardiográfico foi realizado e interpretado por um único médico cardiologista certificado pela Sociedade Brasileira de Cardiologia, a fim de se evitar o viés de observador. A medição da FEVE foi realizada nos tempos T0, T1 e T2.

3.6.2 Eletrocardiograma (ECG)

O ECG de repouso de 12 derivações foi realizado de acordo com diretrizes da SBC, 2016. Desse exame foi extraído o intervalo QT corrigido (ECG-QTc), onde o intervalo QT corresponde à medida do início do QRS ao término da onda T, representando a duração total da atividade elétrica ventricular. Visto

que o intervalo QT é variável de acordo com a FC, procedeu-se a correção pela fórmula de Bazzet (BAZETT, 1920)¹ onde:

$$QTc = \frac{\text{intervalo QT}}{\sqrt{\text{intervalo RR}}}$$

Sendo:

QT medido em milissegundos e distância RR em segundos.

Os valores para o QTc variam com o sexo e são aceitos como normais até 470 msec para mulheres. O ECG foi realizado nos tempos T0, T1 e T2 no ambulatório de cardio-oncologia do HAC/FHEMIG, Belo Horizonte. Foi executado e interpretado por um único médico cardiologista certificado pela Sociedade Brasileira de Cardiologia.

3.6.3 Coleta de sangue

A coleta de amostras de sangue deu-se por punção venosa, obedecendo os critérios de biossegurança vigentes. Para a coleta de sangue, as pacientes estavam em jejum de 8 – 12 horas e todo o procedimento foi realizado em conformidade com as recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial (2010) e com os procedimentos padrões adotados pelo laboratório de patologia clínica do HAC. As amostras de sangue foram coletadas em tubos sem anticoagulante, tubos com EDTA e tubos com citrato de sódio.

Do tubo coletado sem anticoagulante e com EDTA, foi separado o soro ou plasma, respectivamente, por centrifugação a 1.500 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente. Foram separadas alíquotas de aproximadamente 500 µL em tubos de polipropileno e armazenada à temperatura de -80°C até a execução dos ensaios.

Do tubo coletado em citrato de sódio, foi obtido o PPP pela centrifugação a 3.500 rpm por 15 minutos, sendo que os 2\3 superiores do sobrenadante foram

¹ BAZETT, H. C. An analysis of the time-relations of the electrocardiograms. *Heart*, v. 7, p. 353, 1920.

transferidos para um tubo de ensaio e uma nova centrifugação foi realizada a 3.500 rpm por 15 minutos. Apenas 2\3 superiores do sobrenadante foram distribuídos em alíquotas de 500 µL em tubos de polipropileno e armazenadas à -80°C até a execução dos ensaios.

As coletas de sangue foram realizadas no período de junho de 2015 a junho de 2018.

3.6.4 Exames laboratoriais

Os exames hematológicos e bioquímicos foram realizados no laboratório de Patologia Clínica do HAC e seguiu os procedimentos técnicos padrões adotados no local. Foram realizados durante os acompanhamentos clínicos da quimioterapia.

Quadro 5 - Exames laboratoriais: métodos analíticos e valores de referência.

Marcador	Metodologia	Analizador	Valor de referência
Plaquetas	Impedância e citometria de fluxo	ABX Pentra DX 120, <i>Horiba</i>	140 - 400 x 10 ³ /mm ³
cTnI	Imunoensaio, quimioluminescência	VITROS 5600, <i>OrthoClinical Diagnostics</i>	< 0,120 ng/mL
PCR	Imunoensaio enzimático	VITROS 5600, <i>OrthoClinical Diagnostics</i>	< 1,0 mg/dL

cTnI: troponina I; PCR: proteína C reativa

3.7 Definição de cardiotoxicidade

A cardiotoxicidade foi definida pela ocorrência de disfunção miocárdica nova ou agravada durante o acompanhamento do tratamento quimioterápico (ainda que assintomática), caracterizada pela presença de pelo menos um dos critérios abaixo (LÓPEZ-SENDÓN et al., 2020)²

² LÓPEZ-SENDÓN, J. et al. Classification, prevalence, and outcomes of anticancer therapy-induced cardiotoxicity: The CARDIOTOX registry. *European Heart Journal*, v. 41, n. 18, p. 1720–1729, 2020.

1. Níveis alterados dos biomarcadores cTnI e NT-próBNP (Alteração dos biomarcadores é considerada em T1 e T2 em relação à T0):

- cTnI alterado: $> 0,120$ ng/mL;
ou,
- NT-próBNP alterado: > 125 pg/mL se < 75 anos, ou > 450 pg/mL se ≥ 75 anos.

e/ou,

2. Elevação nova dos biomarcadores cTnI e NT-próBNP ainda que FEVE $> 50\%$:

- Elevação nova é definida quando há aumento de 10% dos níveis dos biomarcadores em T1 ou T2 em relação à linha-de-base (T0), ou no T2 em relação ao T1.

e/ou,

3. FEVE $< 50\%$ em T1 e/ou T2.

e/ou,

4. Redução da FEVE de 10% (em T1 e/ou T2), se FEVE em T0 $> 55\%$.

3.8 Escore de risco para TEV

O risco para TEV foi calculado de acordo com modelo “*Comparison of Methods for Thromboembolic Risk Assessment with Clinical Perceptions and AwareneSS in Real Life Patients-Cancer Associated Thrombosis*”, COMPASS-CAT (SPYROPOULOS *et al.*, 2020)³.

Este estudo fornece orientações para pesquisadores e médicos na determinação de fatores de risco clínicos e laboratoriais associados ao desenvolvimento de TEV numa população ambulatorial de pacientes em

³ SPYROPOULOS, A. C. *et al.* External Validation of a Venous Thromboembolic Risk Score for Cancer Outpatients with Solid Tumors: The COMPASS-CAT Venous Thromboembolism Risk Assessment Model. *The Oncologist*, v. 25, n. 7, 2020.

tratamento de câncer de pulmão, mama, colorretal ou ovariano (SPYROPOULOS *et al.*, 2020). Esse modelo considera como preditores variáveis clínicas relacionados à doença em si, ao tratamento e ainda variáveis laboratoriais, como detalhados no **Quadro 6**.

Quadro 6 - Escore COMPASS-CAT para predição de TEV em pacientes ambulatoriais com câncer de pulmão, mama, colorretal ou ovariano, em terapia anticâncer.

Preditores para TEV	Escore
Fatores de risco relacionados ao câncer:	
Terapia anti-hormonal para mulheres com câncer de mama receptor hormonal positivo ou em tratamento com antraciclina	6
Tempo desde o diagnóstico de câncer ≤ 6 meses	4
Cateter venoso central	3
Estágio avançado do câncer	2
Fatores de risco predisponentes:	
Fatores de risco cardiovascular (compostos por pelo menos 2 dos seguintes preditores: história pessoal de doença arterial periférica, acidente vascular cerebral isquêmico, doença arterial coronariana, hipertensão, hiperlipidemia, diabetes, obesidade)	5
Hospitalização recente por doença médica aguda	5
História pessoal de TEV	1
Biomarcadores:	
Contagem de plaquetas $\geq 350 \times 10^9/L$	2

TEV: tromboembolismo venoso. Fonte: SPYROPOULOS *et al.*, 2020.

3.9 Procedimentos experimentais

3.9.1 Determinação do NT-próBNP

A quantificação do NT-próBNP foi realizada em amostras de soro previamente estocadas em alíquotas à -80°C. A determinação foi realizada em uma única rodada experimental em setembro de 2018.

As alíquotas foram previamente descongeladas à temperatura ambiente, seguida de homogeneização em vórtex. Em seguida, foram submetidas à análise automatizada no sistema analisador VITROS 5600 (*OrthoClinical Diagnostics*). O princípio do método baseia-se numa técnica de imunoensaio por quimioluminescência. O ensaio possui intervalo de medição de 11,1 – 35.000,0 pg/mL. Os valores de referência são de 125 pg/mL para indivíduos de idade inferior a 75 anos e de 450 pg/mL para indivíduos de idade igual ou superior a 75 anos.

3.9.2 Determinação de trombomodulina plasmática

A determinação quantitativa de trombomodulina plasmática foi realizada nas amostras de plasma colhido em tubos contendo EDTA como anticoagulante referentes aos tempos T0, T1 e T2. Foi realizada uma rodada única de experimento, em maio de 2019 nas dependências do Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica (LIIM) da Faculdade de Medicina da UFMG.

A metodologia utilizada foi imunoensaio do tipo multiplex (plataforma Luminex® xMAP®), utilizando o *kit Human Cardiovascular Disease Magnetic Bead Panel 4* (EMD Millipore Corporation®) no equipamento MAGPIX® Multiplexing System (Luminex Corporation®, Austin, EUA) seguindo as instruções do fabricante.

3.9.3 Determinação de citocinas plasmáticas

A determinação de níveis plasmáticos de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10) foi realizada nas amostras de plasma colhidas em tubos contendo EDTA como anticoagulante referentes aos tempos T0, T1 e T2. Foi realizada uma rodada única de experimento, em maio de 2019 nas dependências do LIIM.

A metodologia utilizada foi imunoensaio do tipo multiplex (plataforma Luminex® xMAP®), utilizando o kit *Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel – HCYTOMAG-60K* (EMD Millipore®), no equipamento MAGPIX® Multiplexing System (Luminex Corporation®, Austin, EUA) seguindo as instruções do fabricante.

3.9.4 Determinação dos novos biomarcadores cardiovasculares

Os novos biomarcadores cardiovasculares analisados foram: CXCL-16 (*C-X-C motif ligand 16*), FABP3 (*fatty acid binding protein 3*), FABP4 (*fatty acid binding protein 4*), LIGHT (*tumor necrosis factor superfamily member 14/TNFS14*), GDF-15, sCD4 (*soluble form of CD14*) and ucMGP (*uncarboxylated Matrix Gla-Protein*).

A determinação dos níveis plasmáticos desses biomarcadores foi realizada nas amostras de plasma em EDTA, referentes ao tempo T1, de 34 participantes do estudo (selecionadas de forma randômica) e em 34 mulheres hígdas, sem câncer de mama, provenientes do estudo de doutorado da aluna Júnea Paolucci, pareadas por idade com o grupo caso.

Foram realizados imunoensaios do tipo multiplex (plataforma Luminex® xMAP®). Para determinações de CXCL-16, FABP3, FABP4, LIGHT foi utilizado kit HCVD1MAG-67K (Merck®, Darmstadt, Alemanha), de GDF-15 o kit HCVD2MAG-67K (Merck®, Darmstadt, Alemanha), sCD14 e ucMGP pelo kit HCVD6MAG-67K (Merck®, Darmstadt, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante, no equipamento MAGPIX® Multiplexing System (Luminex Corporation®, Austin, EUA) seguindo as instruções do fabricante.

Cada kit foi executado em rodadas experimentais separadas, em novembro de 2021 nas dependências do LIIM.

3.9.5 Ensaio de TGT

O TGT foi realizado no PPP conforme a técnica descrita por Hemker et al. (2003)⁴ e padronizada e validada por Duarte et al. (2019)⁵ no Laboratório

⁴ HEMKER, H. C. *et al.* Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiology of haemostasis and thrombosis*, v. 33, n. 1, p. 4–15, 2003.

Institucional de Pesquisa em Biomarcadores (LINBIO) da Faculdade de Farmácia da UFMG, denominado método CAT (Thrombinoscope BV®, Maastricht, Holanda). Os ensaios foram realizados em novembro e dezembro de 2019.

Antes do ensaio, as amostras de PPP foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 10 minutos. Em seguida, foram homogeneizadas manualmente por inversão 10 vezes e mantidas em temperatura ambiente.

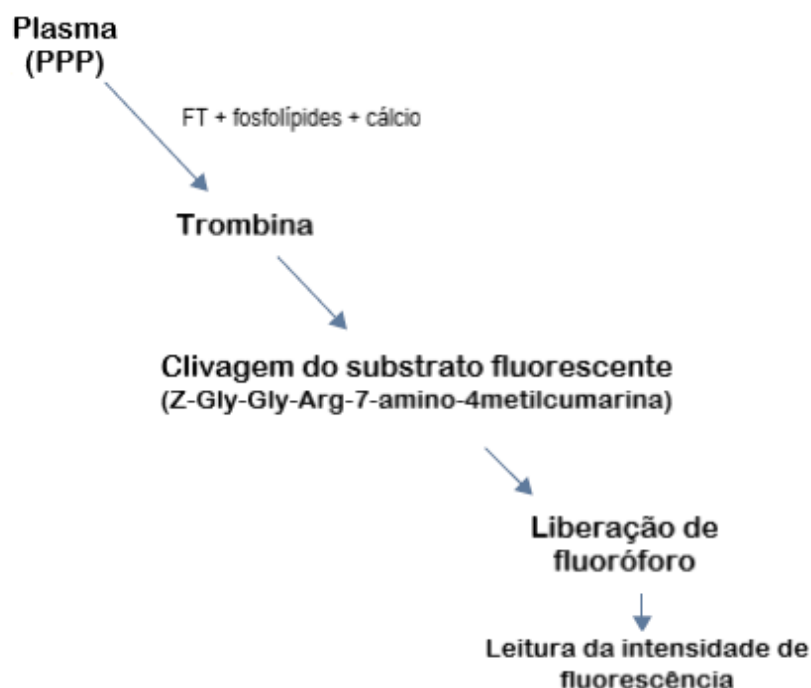
Em uma microplaca de 96 poços de fundo U, foram adicionados 80 µL de PPP das amostras testes e 5 µL de tampão HNBSA (*Hepes/NaCl/BSA*). Paralelamente, para cada amostra teste foi feito um ensaio do calibrador, adicionando 80 µL de PPP das amostras testes, 20 µL do calibrador (α^2M -*Thrombin Calibrator reagente*, STAGO) e 5 µL de tampão HNBSA. Em seguida, posicionou-se a placa no fluorímetro (*Fluoroskan Ascent*, Thermo Laboratories) para incubação a 37°C por 10 minutos.

Após a incubação, foram adicionados, somente nos poços com as amostras testes, 20 µL de fator tissular em baixa concentração: *PPP-Reagent Low* (STAGO). O *PPP-Reagent Low* contém uma mistura de fosfolípides e FT na concentração de 1,0 picomolar. Em seguida, 20 µL de substrato fluorescente- $CaCl_2$ (*Fluca-Kit* STAGO) foram adicionados de forma automatizada em todos os poços da microplaca pelo fluorímetro, procedendo-se a leitura em 60 minutos a 37°C.

O substrato fluorogênico é clivado pela trombina gerada, liberando um fluoróforo que é convertido em concentrações equivalentes de trombina (nM) usando uma curva de referência para medir a taxa de conversão. O *software* Thrombinoscope® foi utilizado para construir a curva de tempo (min) versus concentração de trombina (nM) e para calcular os parâmetros do TGT. O esquema da reação pode ser observado na **Figura 5**.

⁵ DUARTE, R. C. F. *et al.* Standardization and evaluation of the performance of the thrombin generation test under hypo- and hypercoagulability conditions. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*, v. 41, n. 3, p. 244–252, 2019.

Figura 5 – Esquema da reação de formação de trombina e clivagem do substrato fluorescente.



Fonte: adaptado de DUARTE et al., 2017.⁶

3.9.6 Análise de micropartículas por citometria de fluxo

A citometria de fluxo é um método amplamente utilizado nos estudos de MPs devido à sua capacidade de quantificar o número absoluto de partículas e atributos de vários marcadores simultaneamente (SANTOS et al., 2018)⁷. Dessa forma, elaborou-se um painel com objetivo de se proceder uma análise

⁶ DUARTE, R. C. F. et al. Thrombin generation assays for global evaluation of the hemostatic system: perspectives and limitations. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 39, n. 3, p. 259–265, 2017.

⁷ DOS SANTOS, A. M. et al. *Citometria de fluxo: fundamentos e aplicações na pesquisa científica*. Fundação Oswaldo Cruz. 2018. Disponível em: <http://www.ioc.fiocruz.br/pict/PROD_LITERAT/Apostilas/ApostilaCMFCurso_Ferias2018.pdf>. Acesso em: 1 de fev. de 2020.

multiparamétrica, realizando a análise das MPs em tubo único. O painel elaborado encontra-se no **Quadro 7**. Ressalta-se que se utilizou o marcador geral para MPs, anexina V, capaz de se ligar à fosfatidilserina, presente nas membranas das MPs.

Quadro 7 - Painel definido para análise multiparamétrica de micropartículas por citometria de fluxo

Filtro	530/30	575/26	780/60	670/14	450/50
Anticorpo	anti-CD51/61	anti-CD142	anti-CD41a	anti-caveolina-3	Anexina V
Fluorocromo	FITC	PE	PE-Cy7	Alexa Fluor 647	eFluor 450
Especificidade	endotélio	fator tissular	plaqueta	cardiomiócito	fosfatidilserina

As análises foram realizadas no citômetro CytoFLEX (Beckman Coulter Life Sciences®) na plataforma de Citometria de Fluxo do Instituto René Rachou (IRR/FIOCRUZ-Minas). O citômetro foi programado para operar em uma configuração de alta taxa de fluxo, 60 segundos para cada amostra (50.000 eventos, cada). O número de MPs/ μL de plasma foi calculado conforme descrito por Campos et al. (2010)⁸, sendo:

$$\text{MPs } (/ \mu\text{L}) = \frac{N \times 400}{60 \times 100}$$

Em que N é o número de eventos, 400 é o volume total do tubo antes da análise, 60 é o volume da amostra analisada e 100 é o volume original de suspensão de MPs utilizado para realizar o protocolo de fenotipagem.

Os *gates* de tamanho foram determinados com base na distribuição de dispersão frontal (FSC) e lateral (SSC) de microesferas (*beads*) de fluorescência verde de poliestireno de 0,1 μm , 0,2 μm , 0,5 μm , 1,0 μm e 2,0 μm de diâmetros (Flow Cytometry Sub-micron Particle Size Reference Kit, Thermo Fisher Scientific®).

⁸ CAMPOS, F. M. F. *et al.* Augmented plasma microparticles during acute Plasmodium vivax infection. *Malaria journal*, v. 9, p. 327, nov. 2010.

3.10 Análise estatística

Os dados foram analisados nos *softwares* estatísticos R versão 4.0.3 e SPSS® Statistics versão 21. As variáveis categóricas foram apresentadas como valores absoluto e frequências, n (%). Utilizou-se o teste Qui-quadrado para avaliar a diferença entre as frequências.

O teste de Shapiro-Wilk foi aplicado para verificar a normalidade das variáveis quantitativas, que foram apresentadas como média $\pm$ DP ou mediana (percentis 25 e 75). Teste t-Students e ANOVA ou testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis foram usados para determinar diferenças entre dois e três grupos, respectivamente. O teste de Friedman foi aplicado para verificar as diferenças de uma variável contínua entre os pontos de acompanhamento dentro dos grupos. A análise da curva *Receiver Operating Characteristic* (ROC) foi construída para avaliar o desempenho de MPs como biomarcadores discriminatórios para o resultado de cardiotoxicidade, e a área sob a curva (AUC) foi calculada. As correlações foram realizadas usando o teste de correlação de Spearman. O nível de significância adotado foi de 5% (p valor < 0,05).

4. ARTIGO 1

Artigo publicado na *Thrombosis Research*

Thrombosis Research 211 (2022) 56–59



Contents lists available at ScienceDirect

Thrombosis Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/thromres

Letter to the Editors-in-Chief

Hemostatic status in women with breast cancer and cardiotoxicity associated to doxorubicin-based chemotherapy – A one-year follow-up study

ARTICLE INFO

Keywords

Breast cancer
Doxorubicin
Cardiotoxicity
Hemostasis
Thrombin generation

A relationship between malignant disease and the occurrence of coagulation abnormalities is already well established and contributes to morbidity and mortality of cancer patients [1]. Moreover, the risk of venous thromboembolism (VTE) is higher in women with breast cancer than in the general population [2]. Some chemotherapeutic drugs, such as doxorubicin (DOXO), the main anthracycline used as chemotherapeutic agent, has been associated to cardiac damage and hemostatic changes via distinct mechanisms [3]. Therefore, cancer and cardiotoxicity have been reported as important risk factors for hypercoagulability and worse prognosis [4]. Our study aimed to assess hemostatic parameters in women with breast cancer undergoing DOXO-based chemotherapy, with or without cardiotoxicity secondary to treatment, in a one-year follow-up study.

A total of 80 women, with a minimum age of 18 years, and breast cancer were consecutively selected in an outpatient oncology service at Alberto Cavalcanti Hospital, in Belo Horizonte (Brazil), from 2015 to 2018. Exclusion criteria were hospitalized patients or on terminal conditions, under anticoagulant therapy, antiplatelet therapy or other medications based on hemostatic system, with life expectancy <3 months, previous heart disease with left ventricular function (LVEF) <50%, chemotherapy or radiotherapy prior to follow-up, moderate to severe hepatic or renal dysfunction, neurodegenerative diseases, and pregnancy. During the study, no patient underwent surgery or received blood or platelet transfusions. This follow-up included three time points: T0 - initial or prior to neoadjuvant chemotherapy; T1 - at the end of chemotherapy (up to 7 days after); and T2-12 months after the last DOXO cycle.

Cardiotoxicity was defined by the occurrence of new myocardial dysfunction during the post-treatment monitoring chemotherapy (even asymptomatic), including LVEF <50% at T1 and/or T2 or 10% reduction on LVEF after the treatment, troponin I (cTnI) and N-terminal type B natriuretic pro-peptide (NT-proBNP) changes, according to López-Sendón et al. criteria [5].

Platelet count was performed using impedance and flow cytometry (ABX Pentra DX Horiba®). Thrombin Generation Technique (TGT) by CAT method (Calibrated Automated Thrombogram; Thrombinoscope BV®), was applied according to Hemker et al. [6]. CAT method was performed using blood samples that were collected on tube containing

0.106 mol/L of sodium citrate. Platelet-poor plasma (PPP) were obtained by double centrifugation at 3000 ×g for 15 min at room temperature, up to two hours after blood collection. The samples were distributed in aliquots and quickly frozen at –80 °C, which were analyzed within a maximum period of 2 years. A calibrator was carried out for each sample consisting of a mixture of PPP and thrombin calibrator reagent (Diagnostica Stago®, Asnières, France). TF (tissue factor) at 1 picomolar (PPP low reagent, Diagnostica Stago®) was added in wells containing PPP samples to be tested.

Thrombomodulin was performed in plasma samples by multiplex assay kit (MILLIPLEX® MAP Human Cardiovascular Disease, EMD Millipore®), in an equipment MAGPIX® Multiplexing System (MilliporeSigma®) following the manufacturer's protocol.

This study was approved by the Federal University of Minas Gerais (UFMG) Research Ethics Committee (n. 38538714.20000.5149) and FHEMIG Ethics Committee (n. 54,376,216.0.0000.5119), according to World Medical Association Declaration of Helsinki. All participating previously signed the informed consent form.

Statistical analyses were performed in the software R (version 4.0.3). The level of significance adopted was 5% (p value <0.05). Patients that died during the study (three after T1 and four just after T2) were maintained and the absence of any time point was considered as missing data.

Cardiotoxicity was observed in 27 participants of this study (33.7%). The main characteristics of the participants are summarized in Table 1, according to the development or not of DOXO-induced cardiotoxicity. Body mass index (BMI) was significantly different in women who developed cardiotoxicity ($27.3 \pm 4.8 \text{ kg/m}^2$) compared to those who did not develop cardiotoxicity ($30.1 \pm 6.0 \text{ kg/m}^2$, $p = 0.028$).

No significant difference was observed comparing the cTnI levels between the groups. However, comparing the three times of follow-up, in the group with cardiotoxicity, cTnI levels were significantly higher ($p = 0.012$) after the DOXO-chemotherapy cycles (T1) compared to baseline levels (T0). The same was observed in the group without cardiotoxicity ($p = 0.016$). NT-proBNP levels in patients with cardiotoxicity were higher ($p < 0.001$, for T1 and T2) than those without cardiotoxicity. Longitudinally, it was observed that within the group with cardiotoxicity, NT-proBNP levels were significantly lower at baseline

<https://doi.org/10.1016/j.thromres.2022.01.009>

Received 21 September 2021; Received in revised form 23 December 2021; Accepted 10 January 2022

Available online 16 January 2022

0049-3848/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Table 1

Clinical and socio-demographic characteristics of the groups with or without doxorubicin-induced cardiotoxicity, at baseline.

	Cardiotoxicity 33.7% (n = 27)	Non- cardiotoxicity 66.3% (n = 53)	p-value
Age (years)	53.7 ± 12.7	49.2 ± 12.6	0.265
BMI (kg/m ²)	27.3 ± 4.8	30.1 ± 6.0	0.028*
Dose-DOXO (mg/m ²)	375.0 [335.5; 400.0]	400.0 [360.0; 420.0]	0.065
Associated trastuzumab chemotherapy, n (%)	11 (40.7%)	22 (41.5%)	0.947
Hypertension, n (%)	12 (44.4%)	22 (41.5%)	0.816
Diabetes, n (%)	4 (14.8%)	5 (9.4%)	0.477
Histological diagnosis, n (%)			
Invasive ductal carcinoma	24 (88.9%)	48 (90.6%)	
Lobular carcinoma	3 (11.1%)	3 (5.7%)	0.469
Special types	0 (0%)	2 (3.7%)	
HER-2 positive, n (%)	11 (40.7%)	22 (41.5%)	1.000
PR positive, n (%)	8 (29.6%)	20 (37.7%)	0.469
ER positive, n (%)	14 (51.8%)	25 (47.2%)	0.815
Triple negative, n (%)	8 (29.6%)	12 (22.6%)	0.495
Smoking, n (%)			
Yes/former	10 (37.1%)	10 (18.8%)	0.213
No	17 (62.9%)	43 (81.2%)	
Alcohol, n (%)			
Yes/former	2 (7.4%)	2 (3.8%)	0.515
No	25 (92.6%)	51 (96.2%)	
cTnI (ng/mL)			
T0	0.012 [0.012; 0.012]	0.012 [0.012; 0.012]	0.261
T1	0.020 [0.012; 0.026]	0.013 [0.012; 0.025]	0.194
T2	0.012 [0.012; 0.020]	0.012 [0.012; 0.012]	0.087
NT-proBNP (pg/mL)			
T0	54.90 [41.10; 115.50]	58.65 [35.10; 82.73]	0.465
T1	152.00 [75.05; 201.50]	44.00 [32.80; 60.60]	<0.001*
T2	81.30 [61.52; 113.75]	48.20 [30.45; 79.75]	<0.001*
LVEF (%)			
T0	67.0 [65.0; 69.5]	68.0 [66.0; 70.0]	0.226
T1	67.0 [65.0; 68.0]	66.5 [65.0; 68.0]	0.668
T2	66.0 [63.0; 68.0]	67.0 [66.0; 68.0]	0.174

Normally distributed data were expressed as mean ± SD and compared by *t*-test. Data not normally distributed were expressed as median (25th–75th) and compared by Mann–Whitney U. Categorical variables were expressed as frequencies n (%) and compared using the Chi-square test. BMI: body mass index. DOXO: doxorubicin. HER2: human epidermal growth factor receptor 2. PR: progesterone receptor. ER: estrogen receptor; cTnI: troponin I; NT-proBNP: N-terminal type B natriuretic pro-peptide; LVEF: left ventricular ejection fraction; *Significant *p* < 0.05.

compared to T1 (*p* = 0.003) and T2 (*p* < 0.001). In the non-cardiotoxicity group, NT-proBNP levels were lower at the end of the follow-up compared to baseline (*p* < 0.001). Moreover, after the DOXO-chemotherapy cycles, NT-proBNP levels were lower (*p* < 0.001) than at the end of the follow-up.

The results of hemostatic parameters according to the development or not of cardiotoxicity are summarized in Table 2. Platelet's count was not different between groups. However, within the group with cardiotoxicity, platelets count was significantly higher (*p* = 0.022) at baseline (T0) compared to T2 time, while in the group without cardiotoxicity the platelets count was significantly higher at T1 vs T2 (*p* = 0.013). Thrombomodulin levels were also not different between groups. However, within the group without cardiotoxicity, its plasma levels increased significantly during the follow-up (*p* < 0.05 for all comparisons).

Related to TGT parameters, the lag time did not show significant difference between the groups. However, within each group, this

Table 2

Hemostatic parameters in patients undergoing chemotherapy with DOXO according to the development or not of cardiotoxicity.

Parameter	Cardiotoxicity (n = 27)	Non-cardiotoxicity (n = 53)	p-value
Platelets* 10 ³ (/mm ³)			
T0	250.0 [216.5; 298.0]	263.0 [215.0; 312.0]	0.518
T1	250.0 [212.0; 307.0]	273.0 [230.0; 358.0]	0.131
T2	213.5 [180.7; 248.3] ^b	221.0 [184.0; 266.0] ^c	0.590
Trombomodulin (ng/ mL)			
T0	4.1 [3.6; 5.3]	3.3 [2.6; 4.3]	0.083
T1	5.0 [3.9; 6.2]	4.1 [3.2; 5.3] ^a	0.175
T2	5.7 [1.5; 7.0]	4.2 [2.7; 5.7] ^{bc}	0.545
Lag time (min)			
T0	7.0 [5.4; 8.0]	7.3 [6.3; 8.7]	0.216
T1	6.0 [4.9; 6.5]	6.3 [5.7; 7.3]	0.159
T2	6.0 [5.9; 7.3] ^{bc}	6.8 [6.0; 7.8] ^{bc}	0.581
ETP (nM•min)			
T0	2013.5 [1838.3; 2266.0]	1831.6 [1573.1; 2086.7]	0.125
T1	2049.4 [1889.3; 2441.5]	2214.9 [2037.3; 2442.7] ^a	0.264
T2	2025.4 [1874.6; 2284.4]	2218.3 [1944.6; 2505.5] ^{bc}	0.606
Peak (nM)			
T0	388.9 [346.9; 459.1]	351.9 [313.4; 398.1]	0.030*
T1	455.2 [414.4; 527.9]	455.7 [404.5; 499.5] ^a	0.782
T2	444.4 [412.4; 511.4]	403.5 [369.4; 475.0] ^b	0.129
Time to peak (min)			
T0	9.3 [8.0; 10.7]	10.3 [9.3; 11.0]	0.147
T1	8.6 [6.6; 9.7]	8.7 [8.3; 9.8]	0.096
T2	8.6 [8.3; 9.4]	9.3 [8.0; 11.0] ^{bc}	0.096
Velocity index (nM/ min)			
T0	144.5 [105.2; 204.7]	126.6 [88.8; 161.1]	0.108
T1	206.6 [163.8; 256.0] ^a	183.7 [154.9; 233.5] ^a	0.207
T2	186.7 [170.9; 237.5] ^b	155.9 [138.1; 198.5] ^b	0.148
Start tail (min)			
T0	24.7 [22.7; 26.7]	26.3 [25.2; 28.1]	0.037*
T1	25.3 [22.8; 27.4]	26.3 [24.8; 27.6]	0.137
T2	25.5 [24.4; 26.9]	27.0 [25.7; 28.5]	0.116

Non-parametric Wilcoxon test was applied to assess difference between the groups. Friedman test was applied to compare the times of follow-up, being ^a: *p* < 0.05 T0 vs T1; ^b: *p* < 0.05 T0 vs T2; ^c: *p* < 0.05 T1 vs T2. ETP: endogenous thrombin potential. * Significant (*p* < 0.05). Three patients did not complete T2.

parameter was higher at baseline (T0) than at T2 (*p* = 0.045 and <0.001 for the group with and without cardiotoxicity, respectively). Likewise, a significant difference was also observed between T1 versus T2 for both groups (*p* = 0.001 and *p* < 0.001, respectively).

No difference between the groups was observed regarding ETP. However, there was an increase in the ETP values throughout the follow-up in those women who did not develop cardiotoxicity. ETP values observed at baseline (T0) were significantly (*p* < 0.001) lower than in T1, which in turn were also significantly lower (*p* < 0.001) than in T2. The difference was also observed in relation to T2 vs T0 (*p* = 0.074).

At baseline (T0), participants with cardiotoxicity had a higher peak of thrombin (*p* = 0.030) compared to those without cardiotoxicity. Within the group without cardiotoxicity, a lower peak value was observed for T0 when compared to T1 and T2 (*p* < 0.001 for both). There was no significant difference for peak (T0 vs T1 vs T2) in the group with cardiotoxicity.

The t_{peak} was not different between the groups. Interestingly, in the group without cardiotoxicity, time t_{peak} in T2 was significantly shorter (*p* < 0.001) compared to baseline (T0); and at T1, t_{peak} was also significantly shorter (*p* < 0.001) than at the end follow-up in this same group. Similarly, the velocity index did not show difference between the groups. However, in the group with cardiotoxicity, at baseline, velocity

index value was lower than in the first (T1) and second (T2) follow-ups ($p < 0.001$ for both). The same occurred in the group without cardiotoxicity ($p < 0.001$ for both comparisons).

Finally, concerning the start tail, a significant difference was observed only between the groups with and without cardiotoxicity at T0, with lower values in the first group ($p = 0.037$), with no difference among the follow-up times.

It is important to highlight that peripheral venous thrombosis was observed in only one patient, which also presented cardiotoxicity and died during the follow-up (Table 1S - Supplementary material). Among the seven deaths, only three patients presented cardiotoxicity. Their parameters are shown in Table 2S - Supplementary material.

The present study addressed the hemostatic profile of breast cancer patients from the perspective of cardiotoxicity induced by DOXO-based chemotherapy. The main contribution of our study is the evaluation of the hemostatic system through the TGT.

The patients had a borderline BMI for obesity, and women without cardiotoxicity had higher BMI, in agreement to Simões et al. [7]. This fact was also observed by Yoon et al. [8], who reported a low BMI as an independent predictor of left ventricular dysfunction induced by chemotherapy with DOXO.

Thrombomodulin levels increased during follow-up in the group without cardiotoxicity. Thrombomodulin acts in hemostasis as a thrombin ligand, and it is a critical cofactor for protein C system. Higher levels of this protein can indicate an endothelial injury and/or inflammation process [9]. Before chemotherapy, thrombomodulin levels were already at a higher level in the group with cardiotoxicity, remaining elevated in the following follow-up times. Although there was no difference between the two groups (only a trend towards lower levels in the group without cardiotoxicity), the data suggest that patients with higher thrombomodulin levels at T0 may be at greater risk of cardiotoxicity.

Patients with cardiotoxicity had a higher peak of thrombin, but presumably a better mechanism of natural anticoagulation since they presented reduction of the start tail values, at the baseline (T0), compared to the group without cardiotoxicity. In the group without cardiotoxicity, the parameters ETP, peak and velocity index were higher at the end of the follow-up than in baseline (T0). In line with these results, lag time and tpeak were lower. These data suggest a higher thrombin generation, which is persistent even a year after the end of chemotherapy (T2).

Taken together, our results showed hemostatic changes towards to a prothrombotic status in patients treated with DOXO, condition already evident due to breast cancer, even in patients without cardiac dysfunction caused by the chemotherapy. Several factors contribute to blood coagulation activation during cancer development, such as inflammation, venous stasis, and hemostatic system impairment is associated to worst prognostic of the tumor. Moreover, the presence of a subclinical prothrombotic condition might represent the proliferation of tumor cells and disease recurrence [10]. Therefore, TGT, which evaluates the overall systemic procoagulant potential, could be useful to predict thromboembolism and patients at higher risk of death from cancer.

We hypothesize that TGT parameters, main ETP and peak, did not show significant alterations during the follow-up within the group with cardiotoxicity because these parameters were higher at the baseline and remained elevated after the treatment. Consequently, the assumption that these patients could present predisposition to cardiotoxicity before the chemotherapy should be further investigated.

Our data showed that TGT is not only useful for characterizing the hemostatic profile, but also for assessing clinical evolution in patients with breast cancer under chemotherapy. In agreement, Marchetti et al. [10] reported that TGT might be suitable to identify patients at higher risk of cancer recurrence, as well as contribute to stratify patients at different risks of relapse during chemotherapy. Also, Gomez-Rosas et al. [11], which analyzed the ETP performance through a fully automated methodology, showed to be an important method to detect early cancer relapse and underlying mechanisms of cancer-associated

hypercoagulability.

The limitations of our study were the restricted sample size, single-center study design and short follow-up time. However, as far as we know, this is the first study that used TGT to evaluate women with breast cancer and DOXO-induced cardiotoxicity in a one-year follow-up study.

Funding

FAPEMIG/Brazil, CAPES/Brazil and CNPq/Brazil. KBG and MGC are grateful to CNPq Research Fellowship (PQ).

Declaration of competing interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

Prof. Edna Afonso Reis, Amanda Xavier and Letícia Canhestro for the statistical assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2022.01.009>.

References

- [1] A. Falanga, L. Russo, Epidemiology, risk and outcomes of venous thromboembolism in cancer, *Hamostaseologie* 32 (2) (2012) 115–125, <https://doi.org/10.5482/ha-1170>.
- [2] A.J. Walker, J. West, T.R. Card, C. Crooks, C.C. Kirwan, M.J. Grainge, When are breast cancer patients at highest risk of venous thromboembolism? A cohort study using English health care data, *Blood* 127 (7) (2016) 849–857, <https://doi.org/10.1182/blood-2015-01-625582>, quiz 953.
- [3] T.J. Wang, J.C. Evans, E.J. Benjamin, D. Levy, E.C. LeRoy, R.S. Vasan, Natural history of asymptomatic left ventricular systolic dysfunction in the community, *Circulation* 108 (8) (2003) 977–982, <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000085166.44904.79>.
- [4] R.J. Koene, A.E. Prizment, A. Blaes, S.H. Konety, Shared risk factors in cardiovascular disease and cancer, *Circulation* 133 (11) (2016) 1104–1114, <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020406>.
- [5] J. López-Sendón, C. Álvarez-Ortega, P. Zamora Aunón, A. Buño Soto, A.R. Lyon, D. Farmakis, D. Cardinale, M. Canales Albendea, J. Feliu Batlle, I. Rodríguez Rodríguez, Rodríguez, O. Fraga, A. Albaladejo, G. Mediavilla, J.R. González-Juanatey, A. Martínez Monzonis, P. Gómez Prieto, J. González-Costello, J.M. Serrano Antolín, R. Cadenas Chamorro, T. López Fernández, Classification, prevalence, and outcomes of anticancer therapy-induced cardiotoxicity: the CARDIOTOX registry, *Eur. Heart J.* 41 (18) (2020) 1720–1729, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa006>.
- [6] H.C. Hemker, P. Giesen, R. Al Dieri, V. Regnault, E. de Smedt, R. Wagenvoort, T. Lecompte, S. Béguin, Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma, *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 33 (1) (2003) 4–15, <https://doi.org/10.1159/000071636>.
- [7] R. Simões, L.M. Silva, A.N. de Oliveira, M.T. Alves, R.M.C. Pestana, I.D.P. de Souza, H.H.M. Oliveira, C.E. Soares, A.P. Sabino, K.B. Gomes, Identification of clinical and laboratory variables associated with cardiotoxicity events due to doxorubicin in breast cancer patients: a 1-year follow-up study, *Cardiovasc. Toxicol.* 21 (2) (2021) 106–114, <https://doi.org/10.1007/s12012-020-09600-7>.
- [8] H.J. Yoon, K.H. Kim, J.Y. Kim, H.J. Park, J.Y. Cho, Y.J. Hong, H.W. Park, J.H. Kim, Y. Ahn, M.H. Jeong, J.G. Cho, J.C. Park, Chemotherapy-induced left ventricular dysfunction in patients with breast cancer, *J. Breast Cancer* 19 (4) (2016) 402–409, <https://doi.org/10.4048/jbc.2016.19.4.402>.
- [9] H. Loghmani, E.M. Conway, Exploring traditional and nontraditional roles for thrombomodulin, *Blood* 132 (2) (2018) 148–158, <https://doi.org/10.1182/blood-2017-12-768994>.
- [10] M. Marchetti, C. Giaccherini, G. Masci, C. Verzeroli, L. Russo, L. Celio, R. Sarmiento, S. Gamba, C.J. Tartari, E. Diani, A. Vignoli, P. Malighetti, D. Spinelli, N.M. Kuderer, F. Nichetti, M. Minelli, C. Tondini, S. Barni, F. Giuliani, F. Petrelli, A. D'Alessio, G. Gasparini, R. Labianca, A. Santoro, F. De Braud, A. Falanga, Thrombin generation predicts for early recurrence in breast cancer patients, *J. Thromb. Haemost.* 18 (9) (2020) 2220–2231, <https://doi.org/10.1111/jth.14891>.
- [11] P. Gomez-Rosas, M. Pesenti, C. Verzeroli, C. Giaccherini, L. Russo, R. Sarmiento, G. Masci, L. Celio, M. Minelli, S. Gamba, C.J. Tartari, C. Tondini, F. Giuliani, F. Petrelli, A. D'Alessio, G. Gasparini, R. Labianca, A. Santoro, F. De Braud, M. Marchetti, A. Falanga, Validation of the role of thrombin generation potential by a fully automated system in the identification of breast cancer patients at high

risk of disease recurrence, TH Open 5 (1) (2021) e56–e65, <https://doi.org/10.1055/s-0040-1722609>.

Rodrigo M.C. Pestana^a, Rita C.F. Duarte^a, Michelle T. Alves^a, Angélica N. de Oliveira^b, Heloísa H.M. Oliveira^c, Cintia E. Soares^d, Adriano de P. Sabino^a, Luciana M. Silva^c, Maria das Graças Carvalho^a, Ricardo Simões^{a,b}, Karina B. Gomes^{a,*}

^a Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Instituto de Hipertensão, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^c Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^d Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

* Corresponding author at: Department of Clinical and Toxicological Analysis, Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG CEP 31270-901, Brazil.

E-mail address: karinabgb@ufmg.br (K.B. Gomes).

5. ARTIGO 2

Artigo publicado na Blood Coagulation & Fibrinolysis

Short communication 1

Interleukin-10 levels and the risk of thromboembolism according to COMPASS-Cancer associated thrombosis score in breast cancer patients prior to undergoing doxorubicin-based chemotherapy

Rodrigo M.C. Pestana^a, Michelle T. Alves^b, Angélica N. de Oliveira^c,
Heloísa H.M. Oliveira^d, Cintia E. Soares^e, Adriano de P. Sabino^b,
Luciana M. Silva^d, Ricardo Simões^{b,c,e} and Karina B. Gomes^{a,b}

Venous thromboembolism (VTE) is an important cause of morbidity/mortality in cancer patients, and COMPASS-CAT score must be used to VTE-risk prediction. There is a relationship between cytokines and thrombus formation and/or resolution. This study aimed to investigate the VTE risk and cytokines level in breast cancer patients prior to chemotherapy with doxorubicin (DOXO). Eighty women with breast cancer and indication for DOXO treatment were selected. TNF, IL-1 β , IL-6, and IL-10 were measured after the diagnosis and immediately before DOXO treatment. All 80 patients presented a high risk for VTE when evaluated by COMPASS-CAT model (score ≥ 7). A positive correlation was observed between IL-10 plasma levels and VTE risk score. Our data showed that higher IL-10 levels before chemotherapy are associated to increased risk of VTE in breast cancer patients. This finding suggests that IL-10 levels and the combination with COMPASS-CAT score could be good markers to predict increased risk of VTE

in these patients. *Blood Coagul Fibrinolysis* 30:000–000
Copyright © 2022 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

Blood Coagulation and Fibrinolysis 2022, 30:00–00

Keywords: breast cancer, doxorubicin, IL-10, venous thromboembolism risk

^aFaculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, ^bFaculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, ^cInstituto de Hipertensão, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, ^dFundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil and ^eFundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Correspondence to Karina B. Gomes, PhD, Department of Clinical and Toxicological Analyses - School of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais. Presidente Antônio Carlos Avenue, 6627 – Pampulha. Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brazil.
Tel: +55 (31) 3409 6895; e-mail: karinabgb@gmail.com

Received 31 January 2022 Revised 23 May 2022
Accepted 9 June 2022

Introduction

Breast cancer is the most frequent malignancy disease among women with high mortality rates [1]. The well-being of cancer patient is not only influenced by the disease itself but also by antineoplastic treatments, such as surgery, chemotherapy, radiotherapy, or other treatments. Every additional complication increases the burden for the patient and complicates cancer management [2]. Several studies showed that the occurrence of venous thromboembolism (VTE) or arterial thrombosis is associated with decreased life expectancy in patients with cancer. Also, if a thrombotic or embolic event is not diagnosed or treated adequately, it may lead to the patient's death [2,3].

A routine assessment to predict patients at higher risk of cancer-associated thrombosis (CAT) is recommended by international guidelines. The Comparison of Methods for Thromboembolic Risk Assessment with Clinical Perceptions and Awareness in Real Life Patients-Cancer Associated Thrombosis (COMPASS-CAT) score is designed for patients with types of cancer at high risk of VTE associated to treatment (breast, lung, colon, or ovarian cancer), and combines predictors related to the cancer and to the

patient's intrinsic risk factors, such as antihormonal therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer or on anthracycline treatment; time of the cancer diagnosis 6 months or less; central venous catheter use; advanced stage of cancer; previous cardiovascular risk factors; recent hospitalization for acute disease; personal history of VTE; and platelets count at least $350 \times 10^3/\mu\text{L}$. Patients with score at least 7 are at higher risk [4].

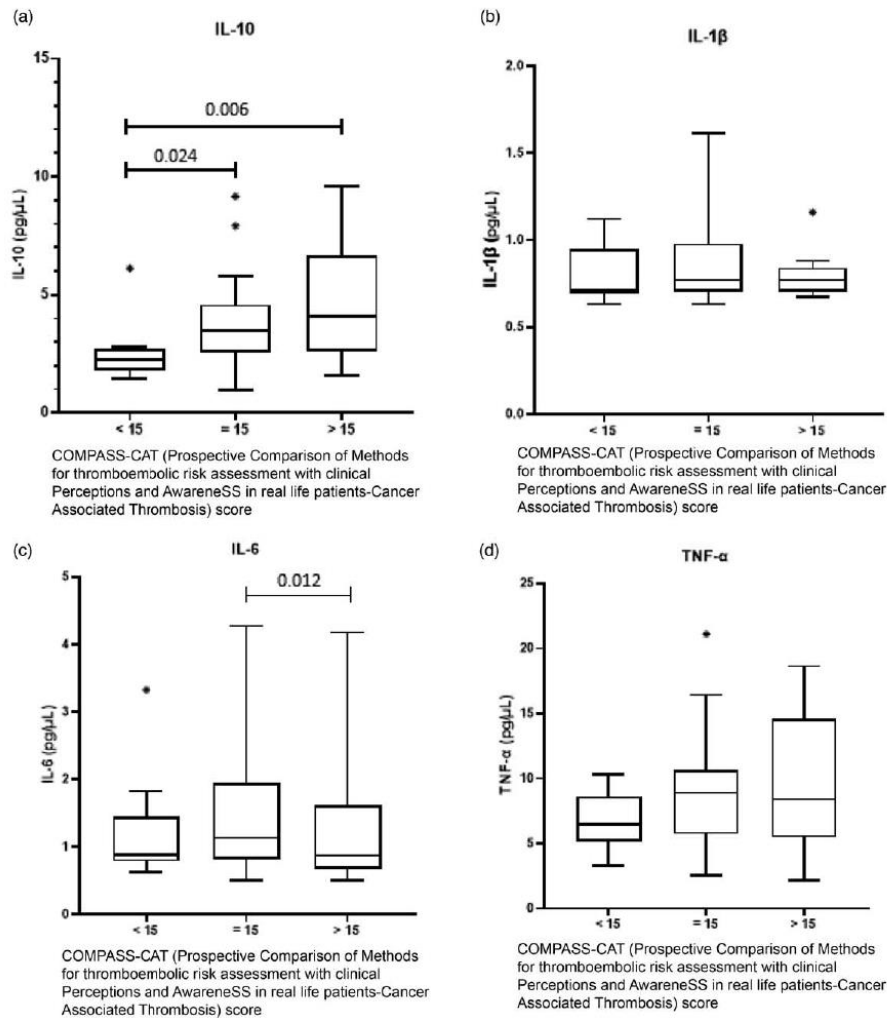
The progression of tumors is essentially dependent on the microenvironment, which also consists of various inflammatory cells, mainly tumor-associated macrophages. Therefore, it seems that current chemotherapy and hospitalizations just speed up and subsequently strengthen the initial inflammatory process stimulated by tumoral cells. Moreover, both cancer and the treatments contribute to the susceptibility of these patients to develop VTE [5,6]. Several studies suggest that inflammation also participates in venous thrombogenesis [6,7]. Cytokines change the normal anticoagulant and profibrinolytic properties of the endothelium to an activated state that raises thrombus formation and stalls fibrinolysis [7]. We showed in a previous study that higher levels of interleukin (IL)-10 were found in breast cancer patients who developed

patient presented a personal history of VTE or central venous catheter use at the moment of the blood collection. However, it is important to highlight that 12 months after the last chemotherapy cycle, three patients presented deep vein thrombosis – two patients had a COMPASS-CAT score of 10, and one patient presented a score of 17.

The clinical characteristics according to the COMPASS-CAT score are presented on Table 1. The mean age was

51.8 ± 11.6 years old, and the median dose of DOXO was 380 (360–400) mg/m². The prevalence of diabetes was 11.3% and hypertension was 42.5%. The dominant histological type was invasive ductal carcinoma (90%). At the baseline, the platelet count (× 10³/μl) was 252.0 (209–306 platelets × 10³/μl). There was a higher prevalence of hypertensive women in the group with a score of 15 compared with the group with a score of less than 15 (*P* = 0.002). No difference was observed for the other

Fig. 1



Cytokine's plasma levels and categorical COMPASS-CAT score in breast cancer patients undergoing doxorubicin-based chemotherapy. (a) IL-10, (b) IL-1β, (c) IL-6, (d) tumor necrosis factor. COMPASS-CAT score, Comparison of Methods for Thromboembolic Risk Assessment with Clinical Perceptions and Awareness in Real Life Patients-Cancer Associated Thrombosis score. COMPASS-CAT (Prospective Comparison of Methods for thromboembolic risk assessment with clinical Perceptions and Awareness in real life patients-Cancer Associated Thrombosis) score.

variables between the groups ($P > 0.05$). All subjects had breast cancer diagnosis 6 months or less.

The levels of TNF, IL-1 β , IL-6, and IL-10 in groups are presented in Fig. 1. Breast cancer patients with VTE score risk less than 15 presented lower plasma IL-10 levels [2.8 (2.2–3.3) pg/ μ l] than those with VTE score risk of 15 [3.5 (2.5–5.8) pg/ μ l, $P = 0.024$] and VTE score risk greater than 15 [5.1 (2.8–7.8) pg/ μ l, $P = 0.006$]. IL-6 levels were higher [1.5 (1.0–3.8) pg/ μ l] in score risk of 15 group compared with score risk greater than 15 group [0.98 (0.7–1.50) pg/ μ l], $P = 0.012$. TNF and IL-1 β levels did not show difference between the groups (all $P > 0.05$).

A positive correlation was observed between IL-10 plasma levels and VTE risk score ($r = 0.337$, $P = 0.006$). For IL-1 β ($r = 0.284$), IL-6 ($r = 0.017$) and TNF ($r = 0.241$), there was no significant correlation with the VTE score ($P > 0.05$, for all). η^2 was 0.209 for IL-10 and 0.142 for IL-6 (considered large effect size); 0.038 for IL-1 β and 0.028 for TNF (considered small effect size) [10].

Discussion

Proinflammatory mediators are increased in VTE, and some of them, particularly TNF, have been shown to be capable of independently predicting the risk of VTE [11]. However, in our study, the IL-1 β , IL-6, and TNF levels did not show significant correlation with VTE score risk, in agreement with Reitter *et al.* [12].

As far as we know, this is the first study that showed a relationship between IL-10 and VTE risk score in breast cancer women before chemotherapy. Our results suggest that higher IL-10 levels could be related to increased VTE risk in this group as a large effect size was observed between IL-10 levels and COMPASS-CAT score.

IL-10, a major immunoregulatory and anti-inflammatory cytokine, has been associated with breast cancer initiation and progression, as well as to deep vein thrombosis [13]. In fact, the tumor microenvironment of breast cancer patients is characterized by the activation of different signaling pathways, such as NF- κ B, COX-2, and JAK/STAT, which induce the expression and secretion of various proinflammatory and anti-inflammatory cytokines, such as IL-10 [14]. It is known that IL-10 is expressed at a higher level by metastatic cancer in order to downregulate the inflammatory status. IL-10 levels are also associated with cancer initiation and progression. Mohamed *et al.* showed that IL-10 stimulated the expression of carboxypeptidase B2 (CPB2, the gene-encoding thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor – TAFI), which inhibits lysis of the fibrin clot by removing C-terminal lysine residues from fibrin, decreasing plasminogen activation, and finally fibrinolysis [14]. In agreement, treatment of HepG2 cells with IL-10 increased TAFI protein levels by two-fold in other study [15]. Therefore, we hypostatized that IL-10 is released as a counter-regulator of the hemostatic impairment and pro-

inflammatory status in patients with breast cancer, which present higher DOXO-induced VTE risk before the treatment.

Conclusion

Our results suggest that IL-10 levels are associated to the increased risk of VTE in patients with breast cancer before treatment with DOXO. Therefore, IL-10 levels in combination with the COMPASS-CAT score could be a good candidate as biomarker to predict increased risk of VTE in these patients, which should be closely monitored to predict possible thrombotic outcomes or complications during the chemotherapy treatment.

Acknowledgements

The study was performed with the support of Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

K.B.G. and M.T.A. are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq for the research fellowship.

R.M.C.P. is grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES for the research fellowship.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

References

- 1 Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021; **71**:209–249.
- 2 Moik F, Ay C, Pabinger I. Risk prediction for cancer-associated thrombosis in ambulatory patients with cancer: past, present and future. *Thromb Res* 2020; **191** (Suppl 1):S3–S11.
- 3 Grilz E, Königsbrügge O, Posch F, Schmidinger M, Pirker R, Lang IM, *et al.* Frequency, risk factors, and impact on mortality of arterial thromboembolism in patients with cancer. *Haematologica* 2018; **103**:1549–1556.
- 4 Gerotziakas GT, Mahé I, Lefkou E, AboElazaz E, Abdel-Razeq H, Taher A, *et al.* Overview of risk assessment models for venous thromboembolism in ambulatory patients with cancer. *Thromb Res* 2020; **191** (Suppl 1):S50–S57.
- 5 Aue G, Nelson Lozier J, Tian X, Cullinane AM, Soto S, Samsel L, *et al.* Inflammation, TNF α and endothelial dysfunction link lenalidomide to venous thrombosis in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol* 2011; **86**:835–840.
- 6 Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; **420**:860–867.
- 7 Vazquez-Garza E, Jerjes-Sanchez C, Navarrete A, Joya-Harrison J, Rodriguez D. Venous thromboembolism: thrombosis, inflammation, and immunothrombosis for clinicians. *J Thromb Thrombolysis* 2017; **44**:377–385.
- 8 Alves MT, Simões R, Pestana RMC, de Oliveira AN, Oliveira HHM, Soares CE, *et al.* Interleukin-10 levels are associated with doxorubicin-related cardiotoxicity in breast cancer patients in a one-year follow-up study. *Immunol Invest* 2021; **51**:883–898.
- 9 Spyropoulos AC, Eldredge JB, Anand LN, Zhang M, Qiu M, Nourbadi S, Rosenberg DJ. External validation of a venous thromboembolic risk score for cancer outpatients with solid tumors: the COMPASS-CAT Venous Thromboembolism Risk Assessment Model. *Oncologist* 2020; **25**:e1083–e1090.
- 10 Pierce CA, Block CA, Aguinis H. Cautionary note on reporting eta-squared values from multifactor anova designs. *Educ Psychol Meas* 2004; **64**:916–924.

- 11 Saghazadeh A, Rezaei N. Inflammation as a cause of venous thromboembolism. *Crit Rev Oncol Hematol* 2016; **99**:277–285.
- 12 Reitter EM, Ay C, Kaider A, Pirker R, Zielinski C, Zlabinger G, *et al.* Interleukin levels and their potential association with venous thromboembolism and survival in cancer patients. *Clin Exp Immunol* 2014; **177**:253–260.
- 13 Zhang Y, Miao X, Zhang Z, Wei R, Sun S, Liang G, *et al.* miR-374b-5p is increased in deep vein thrombosis and negatively targets IL-10. *J Mol Cell Cardiol* 2020; **144**:97–108.
- 14 Mohamed HT, El-Husseiny N, El-Ghonaimy EA, Ibrahim SA, Bazzi ZA, Cavallo-Medved D, *et al.* IL-10 correlates with the expression of carboxypeptidase B2 and lymphovascular invasion in inflammatory breast cancer: the potential role of tumor infiltrated macrophages. *Curr Probl Cancer* 2018; **42**:215–230.
- 15 Komnenov D, Scipione CA, Bazzi ZA, Garabon JJW, Koschinsky ML, Boffa MB. Pro-inflammatory cytokines reduce human TAFI expression via tristetraprolin-mediated mRNA destabilisation and decreased binding of HuR. *Thromb Haemost* 2015; **114**:337–349.

6. ARTIGO 3

Artigo submetido nos Arquivos Brasileiros de Cardiologia

Original Article

NEW CARDIOVASCULAR BIOMARKERS IN BREAST CANCER PATIENTS UNDERGOING DOXORUBICIN-BASED CHEMOTHERAPY

Running head: New cardiovascular biomarkers in breast cancer

Rodrigo M. C. Pestana^{1,2}, Júnea P. P. Silvino¹, Angélica N. de Oliveira², Cintia E. Soares³,
Adriano de P. Sabino⁵, Ricardo Simões^{2,3,4}, Karina B. Gomes^{1,5*}

1 - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

2 - Instituto de Hipertensão, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

3 - Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

4 - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

*Corresponding author:

Karina Braga Gomes, PhD.

Department of Clinical and Toxicological Analyses - School of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais. Presidente Antônio Carlos Avenue, 6627 – Pampulha. Belo Horizonte, Minas Gerais – Brazil. Zip code: 31270-901. Phone number: +55 (31) 3409-6895. E-mail: karinabgb@gmail.com. ORCID: 0000-0002-6870-2063.

Word count: 5739

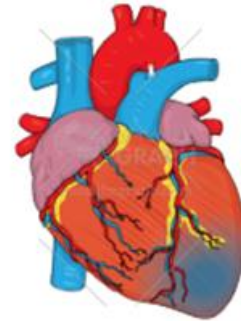
Count of tables: 3

Count of figures: 2

Central Illustration



Doxorubicin-based
chemotherapy for breast cancer



Doxorubicin-
cardiotoxicity



Novel plasma cardiovascular
biomarkers:

GDF-15

FABP3

FABP4

sCD14

ucMGP

Abstract

Background: Cardiovascular diseases (CVDs) are relevant to the management of breast cancer treatment, since a significant number of patients develop these complications after chemotherapy. **Aim:** This study aimed to evaluate new cardiovascular biomarkers: CXCL-16 (C-X-C motif ligand 16), FABP3 (fatty acid binding protein 3), FABP4 (fatty acid binding protein 4), LIGHT (tumor necrosis factor superfamily member 14/TNFS14), GDF-15 (Growth/differentiation factor 15), sCD4 (soluble form of CD14) and ucMGP (uncarboxylated Matrix Gla-Protein) in breast cancer patients treated with doxorubicin (DOXO). **Material and Methods:** This case-control study was carried out in an oncology clinic that included 34 women diagnosed with breast cancer and chemotherapy with DOXO and 34 control women without cancer and CVD. The markers were determined immediately after the last cycle of chemotherapy. Data were analyzed using SPSS Statistics software. The statistical significance level adopted was 5%. **Results:** The breast cancer group presented higher levels of GDF-15 ($p < 0.001$), while control subjects had higher levels of FABP3 ($p = 0.038$), FABP4 ($p = 0.0003$), sCD14 and ucMGP ($p < 0.001$ for both). Positive correlations were observed between FABPs and BMI in the cancer group. **Conclusion:** GDF15 is an emerging biomarker with potential clinical applicability in this scenario. FABPs are proteins related to adiposity, which are potentially involved in breast cancer biology. sCD14 and ucMGP are involved in the inflammatory and vascular calcification. Above all, the evaluation of these novel cardiovascular biomarkers is useful in the management of breast cancer chemotherapy in order to detect adverse events early.

Keywords: Breast cancer; cardiovascular diseases, doxorubicin; cardiovascular biomarkers.

1. Introduction

Cardiovascular diseases (CVDs) and cancer are the leading causes of death worldwide⁽¹⁾. Continuous improvements in strategies for prevention and anti-cancer treatments in patients with breast cancer significantly reduced the death from cancer-related causes; however, there was an increased risk of death from CVD in this group of patients⁽²⁾. The reasons for this synergism between cancer and CVD are the common risk factors (including diabetes mellitus, hypertension, hypercholesterolemia and obesity), as well as pathophysiological mechanisms underlying CVD that are associated with an increased risk of cancers^(3,4).

Anthracycline-based regimens, like doxorubicin (DOXO), are some of the most effective treatments of breast cancer and are responsible for the improved disease-free survival and overall survival in this group. Nevertheless, anthracyclines can result in severe short and long-term toxicity, including cardiotoxicity and secondary haematological malignancy⁽⁵⁾.

Many studies have proposed the use of plasma biomarkers, especially troponins and B-type natriuretic peptides, to monitor anthracycline cardiotoxicity for the early detection of these cardiovascular complications^(6–8). More recently, these biomarkers have been included as diagnosis criteria of cardiotoxicity in addition to cardiologic imaging exams and their modalities and clinical features^(9,10). Other biomarkers underlie the pathophysiological changes that occur during heart failure. Heart failure manifests as decreased left ventricular ejection fraction (LVEF) or symptomatic heart failure in up to 5% of patients⁽¹¹⁾. In a prospective study, Cardinale et al.⁽¹²⁾ found an overall incidence of cardiotoxicity of 9% using the decrease in LVEF as a single criterion to define cardiotoxicity. However, in another prospective study, López-Séndon et al.⁽¹⁰⁾ expanded the criteria for defining cardiotoxicity beyond changes in LVEF, including the use of plasma biomarkers and cardiotoxicity, which was identified in 37.5% patients during the follow-up.

Chemokines are pro-inflammatory chemoattractant cytokines that act primarily in leukocyte trafficking, regulate cell migration, proliferation and survival and are key components in cancer biology⁽¹³⁾. CXCL-16 (C-X-C motif ligand 16) is a chemokine expressed in lymphoid organs, the liver, lungs, small intestine and kidney. CXCL-16 expression is increased by pro-inflammatory cytokines, important for the accumulation of immune cells at the inflammatory reaction sites⁽¹⁴⁾.

LIGHT (tumor necrosis factor superfamily member 14/TNFS14) belongs to the tumor necrosis factor superfamily and is expressed by different types of immune cells. LIGHT signals through two receptors and has distinct functions that are cell-type dependent, but interactions with these types of receptors have immune-related implications in tumor biology^(15,16).

Growth/differentiation factor 15 (GDF-15) is a divergent member of the transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily and is also known as macrophage inhibitory cytokine (MIC)-1⁽¹⁷⁾. GDF-15 is also related to the evolution of cancer both positively and negatively, since GDF-15 inhibits early tumor promotion, but its abnormal expression in advanced cancers causes cancer stem cell formation, proliferation, invasion, metastasis, immune escape and a reduced response to therapy⁽¹⁸⁾.

Matrix-carboxyglutamate (Gla) protein (MGP) is a vitamin K-dependent protein and a strong inhibitor of vascular calcification. Vitamin K deficiency leads to inactive uncarboxylated MGP (ucMGP), which accumulates at sites of arterial calcification⁽¹⁹⁾. Biologically inactive, desphospho-ucMGP is a marker of vascular vitamin K status and is described to predict mortality in patients with heart failure and aortic stenosis⁽²⁰⁾.

The human monocyte differentiation antigen CD14 is a pattern recognition receptor (PRR) that enhances innate immune responses. CD14 was first identified as a marker of monocytes

to signal intracellular responses upon bacterial encounters⁽²¹⁾. Soluble forms of CD14 (sCD14) could be secreted by activated cells, which release CD14 by proteinase dependent or independent shedding⁽²²⁾.

The FABPs (fatty acid binding proteins) are expressed in proteins in almost all tissues. These proteins are responsible for control of fat acid transport, metabolism and storage. FABPs are proposed to be central regulators of lipid metabolism, inflammation and energy homeostasis⁽²³⁾. FABP3 is a cytosolic protein found primarily in the heart but also in the muscle, brain and kidney⁽²⁴⁾; some studies have suggested that FABP3 has superior sensitivity to troponin for detecting ischemic injury and cardiac injury associated with congestive heart failure^(25,26). FABP4 is mainly expressed in adipocytes and macrophages and plays an important role in the development of insulin resistance and atherosclerosis. Circulating FABP4 levels are associated with several aspects of metabolic syndrome and cardiovascular disease⁽²⁷⁾.

The implementation of new laboratory biomarkers has been a priority in cardio-oncology, particularly for early detection of cardiotoxicity secondary to chemotherapy. In this context, this study aimed to evaluate new cardiovascular biomarkers, such as CXCL-16, FABP4, LIGHT, GDF-15, sCD14 and ucMGP in breast cancer patients under DOXO-based chemotherapy.

2. Subjects and Methods

2.1 Human samples

This is a case-control study performed with outpatients from the Oncology Service at Alberto Cavalcanti Hospital/FHEMIG (Belo Horizonte, Brazil), which included 34 women aged ≥ 18 years old diagnosed with breast cancer and using neoadjuvant therapy with DOXO, who were attended from June 2015 to June 2018. Exclusion criteria in case group: presence of

previous heart disease with impaired left ventricular function, moderate to severe hepatic or renal dysfunction, degenerative brain diseases requiring caregivers and pregnant women or patients with a life expectancy less than 3 months. Moreover, women submitted to previous chemotherapy, hormone therapy, immunotherapy or radiation therapy were excluded. The control group was formed by 34 healthy subjects aged ≥ 18 years old without any malignant disease or the presence of previous heart disease, moderate to severe hepatic or renal dysfunction, degenerative diseases and no pregnancy, attested by a clinical physician.

Clinical characteristics of breast cancer patients were obtained from hospital medical records. Prior to chemotherapy, patients with breast cancer underwent a medical evaluation with a certified cardiologist, who performed an electrocardiogram and echocardiogram bidimensional including tissue mode with Vivid S6 echocardiographic (GE Medical Systems Healthcare®, Tirat Carmel, Israel) with LVEF assessment. No alterations in these exams were observed. The cardiovascular risk of patients with breast cancer was calculated according to the global risk score (Framingham Heart Study)⁽²⁸⁾ before cancer treatment.

The study was approved by the UFMG Research Ethics Committee (n. 38538714.20000.5149) and FHEMIG Ethics Committee (n. 54376216.0.0000.5119), according to World Medical Association Declaration of Helsinki. All participants previously signed the informed consent form.

2.2 Experimental and laboratory protocols

Fasting blood collection was carried after the chemotherapy DOXO-based (out up to 7 days after the last DOXO cycle). For plasma preparation, the EDTA tube was centrifuged for 10 minutes at 1000g within 30 minutes of blood collection and for serum preparation the tube without additive was centrifuged at 3000g for 15 min. The plasma and serum samples were distributed in aliquots and immediately stored at -80°C until assayed.

The cardiovascular markers levels were determined by Multiplexed Immunoassays using a Luminex[®] xMAP[®] platform. EDTA-plasma was used for determinations of CXCL-16, FABP3, FABP4, LIGHT (HCVD1MAG-67K kit; Merck[®], Darmstadt, Germany), GDF-15 (HCVD2MAG-67K kit; Merck[®], Darmstadt, Germany), sCD14 and ucMGP (HCVD6MAG-67K kit; Merck[®], Darmstadt, Germany), according to manufacturer's instructions in a MAGPIX[®] Multiplexing System Analyzer (Luminex Corporation[®], Austin, USA).

Levels of cTnI (troponine I) and NT-proBNP (fraction NT of natriuretic peptide type B), as well as LVEF to monitor cardiac dysfunction assessment, were determined according to the protocols described in our previous study⁽²⁹⁾. Total cholesterol and HDL-cholesterol were performed by colorimetric assay on VITROS 5600 (Ortho Clinical Diagnostics[®], Rochester, USA). LDL-cholesterol was calculated by Friedwald formula.

2.3 Statistical analysis

Data were analyzed using IBM[®] SPSS[®] Statistics software (for Windows[®]; Chicago, Illinois, USA, version 21). The Shapiro-Wilk test was used to verify the normality of quantitative variables, which were presented as the mean $\pm$ standard deviation (SD) or median (25th–75th percentiles). Unpaired Student's *t* test and ANOVA One-Way or the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis test (followed by the Bonferroni test) determined the differences between two and three groups, as appropriate. Categorical variables were presented as n (%). Correlations were performed using Spearman's correlation test. Receiver operating characteristic (ROC) curves were used to represent the sensitivity and specificity. The significance level adopted was 5%.

3. Results

Prior to chemotherapy, patients with breast cancer presented a mean age of 50.2 ± 11.3 years and body mass index (BMI) of 27.9 ± 5.9 kg/m². Control subjects had a mean age of

46.9 ± 16.9 years and BMI of 26.5 ± 6.2 kg/m² (all $p > 0.05$). The more frequent Framingham cardiovascular risk category was low risk (44.1%). After the treatment, all breast cancer patients had a normal ventricular function (LVEF ≥ 50%) with a mean LVEF of 66.97 ± 2.33%. Eleven (32.3%) patients presented NT-proBNP levels above the reference value (<125.0 pg/mL if <75 years, or <450.0 pg/mL, if ≥75 years), but no alteration on cTnI levels (normal range <0.120 ng/mL) was found in the breast cancer group. No patient presented clinical cardiotoxicity. Other characteristics of breast cancer patients are summarized in **Table 1**.

The comparison of cardiovascular markers between breast cancer and the control group is described in **Figure 1**. Breast cancer patients had higher plasma levels of GDF-15 ($p < 0.001$) and lower FABP3 ($p = 0.038$), FABP4 ($p = 0.003$), sCD14 and ucMGP ($p < 0.001$) levels compared to the control group. For GDF-15, it was observed an area under the ROC curve = 0.825 ($p < 0.001$, IC=0.722-0.927) (**Figure 2**). FABP3 ($r = 0.344$; $p = 0.046$) and FABP4 ($r = 0.479$; $p = 0.004$) were positively correlated to BMI in the breast cancer group.

It is interesting to note that the levels of GDF-15 were higher in triple negative group compared to other molecular groups ($p = 0.030$), but this difference was non-significant when applied the Bonferroni's test. (**Table 2**). According, FABP3 levels were also higher levels in the group with high Framingham cardiovascular risk ($p = 0.022$), but non-significant after Bonferroni's correction (**Table 3**). No other cardiovascular marker showed differences in plasma levels according to the molecular type of tumor or cardiovascular risk.

4. Discussion

The investigation, monitoring and evaluation of cardiovascular injury in breast cancer patients under chemotherapy regimens have been widely studied. However, studies that include emerging biomarkers that are able to detect the cardiovascular impairment in breast

cancer patients under DOXO-based chemotherapy early, independent of clinical cardiotoxicity, are rare. Therefore, the main findings of our study are: (i) breast cancer patients had higher GDF-15 levels, which showed good relationship with clinical diagnosis according to the area under the ROC curve; (ii) breast cancer patients had lower levels of FABP3, FABP4, sCD14 and ucMGP; and (iii) there was a positive correlation between FABPs and BMI.

GDF-15 is a strong and independent predictor of CVD, cancer morbidity and mortality in community-dwelling individuals⁽³⁰⁾. The breast cancer group had GDF-15 levels that were 8.12-fold higher than in healthy subjects. In breast cancer, GDF-15 has been associated with metastasis and resistance toward trastuzumab⁽³¹⁾. GDF-15 increases due to several pathophysiological conditions; thus, elevated GDF-15 levels must be carefully interpreted. In this study, the reason(s) associated with increased GDF-15 levels in breast cancer patients remain unclear, since breast cancer biology and DOXO-chemotherapy are both conditions that can promote GDF-15 changes. GDF-15 is an emerging biomarker which is elevated in early subclinical disease and has prognostic utility for cardiovascular events and mortality⁽³²⁾. In this way, robust case-control studies that include at least one group of breast cancer patients treated with another class of chemotherapy medications could be useful to clarify our hypothesis.

A prospective cohort by Demissei et al.⁽⁶⁾ included 323 breast cancer patients who were treated with anthracycline- and/or trastuzumab-based regimens. In that study, no association between GDF-15, troponin, myeloperoxidase and placental growth factor levels with changes in LVEF was found. Also, no changes in the GDF-15 levels were observed in the two years of study. In the baseline, GDF-15 levels in breast cancer patients who received DOXO-treatment were 704 [532–908] pg/mL and 599 [523–722] pg/mL for patients who received DOXO+Trastuzumab. In our study, GDF-15 was higher in triple negative patients, but the

difference was not significant, which requires further studies with the largest population. In a multicenter cohort study, GDF-15 levels remained elevated even after 15 months of study in breast cancer patients (HER2+) under adjuvant therapy with an anthracycline-containing regimen followed by taxanes and trastuzumab⁽³³⁾.

FABP4 levels were lower in breast cancer patients than in controls in our study, which is an unexpected finding in agreement with Tsakogiannis et al.⁽³⁴⁾. FABP4 is highly expressed in adipocytes, but breast cancer patients did not show any differences in BMI compared to healthy controls. However, BMI is not the best method to evaluate adiposity; other markers of body fat composition should be applied to correlate with FABP4 levels. In fact, its levels showed a correlation with BMI in the breast cancer group in our study. Contrary to our observations, another case-control study found higher levels of FABP4 in breast cancer patients in contrast with healthy women and higher levels in luminal type breast cancer compared to HER2+/triple negative. However, they also suggest that BMI in breast cancer could be a factor affecting the expression of FABP4 because patients with breast cancer and a BMI ≥ 25 kg/m² presented higher levels of FABP4⁽³⁴⁾. These data emphasize that FABPs are expressed by adipose tissue. Also, circulating FABP4 enhances the tumor stem cell-like phenotype via IL-6/STAT3/ALDH1-mediated activity, suggesting that circulating FABP4 released by host adipose tissue might trigger the exit from tumor dormancy⁽³⁵⁾ and that FABP-4 is upregulated in certain subsets of macrophages in breast/mammary tumors, which enhances their ability to promote tumor growth and metastasis through IL-6-dependent pathways⁽³⁶⁾.

FABP3 levels were also lower in the breast cancer group compared to controls. It is known that FABP3 plays a key role in cardiomyocyte metabolism. However, we can hypothesize that DOXO-chemotherapy could promote a decrease in FABP3 synthesis in cardiac tissue because DOXO induces cardiomyocyte apoptosis⁽³⁷⁾. This was experimentally

demonstrated by Sayed-Ahmed et al.⁽³⁸⁾, where the chronic use of DOXO resulted in significant and dose-dependent decrease in FABP3 mRNA expression in cardiac tissue. Moreover, the loss of cellular lipid metabolism homeostasis due to reduced intracellular FABP3 content and impaired fatty acid supply seems to be a plausible hypothesis for the progression of heart failure and other CVDs⁽³⁹⁾.

Conway et al. demonstrated that the FABP3 gene promoter was hypermethylated and gene expression was reduced in breast cancer, indicating that FABP3 expression has an inhibitory effect on breast cancer⁽⁴⁰⁾. On the other hand, FABP3 is a heart injury marker, since elevated levels are useful for the early diagnosis of acute myocardial infarction⁽⁴¹⁾. Plasma levels of FABP3 have already been investigated in the context of breast cancer chemotherapy. However, no differences were observed in those individuals who developed cardiotoxicity secondary to anthracyclines compared to individuals without onset cardiotoxicity⁽⁴²⁾. Substantial experimental and clinical studies are necessary to clarify the FABP3 behavior in this context. The positive correlation between FABP3 and FABP4 with BMI was already expected, since these markers are directly associated with adipose tissue and lipid metabolism.

Although lower sCD14 levels were observed in breast cancer patients in our study, this is controversial, as some studies have shown that sCD14 levels were higher in patients with cancer than in patients with benign disease or healthy individuals^(43,44). The outcome of CD14 in inflammation is multifactorial, including the site of inflammation, CD14 expression level, characteristics of CD14 ligands and competition between different CD14-dependent pathways⁽²¹⁾. CD14 is also expressed on the cell membranes of cardiomyocytes⁽⁴⁵⁾ and the apoptotic DOXO-effect on cardiomyocyte could reduce the soluble CD14. Also, sCD14 levels have also been determined in other studies as an acute phase reactant⁽⁴⁶⁾, but the patients evaluated were not in acute inflammatory phase, evaluated by C-reactive protein

(CRP) measurements (data not shown). Therefore, these results should be interpreted cautiously and future studies in this context should be carried out in order to determine the role of sCD14 in this scenario.

Breast cancer patients also had lower ucMGP plasma levels compared to control subjects. According to Yoshimura et al.⁽⁴⁷⁾, the MGP gene is up-regulated in cases where the prognosis was poor, indicating that the mRNA levels of MGP are a potential prognostic indicator of breast cancer. However, no difference was observed in the protein expression by the tumor using immunohistochemistry. On the other hand, lower ucMGP levels were causally related to a decreased risk of coronary heart disease⁽⁴⁸⁾. The inactive forms of MGP (like uc-MGP) are useful biomarkers of vitamin K deficiency, vascular calcification and CVD and may predict a future risk of death or cardiovascular events. It is a vitamin K-dependent protein (VKDP), and it is released from cells into the bloodstream. Vitamin K attenuates inflammatory responses by blocking nuclear factor κ B (NF- κ B) signal transduction. Higher levels of ucMGP reflect the vascular calcification, which is one of the major risk factors of cardiovascular morbidity and mortality^(49,50). In this way, our data suggest that DOXO-administration does not induce a short-term cardiovascular calcification, which is an unlikely mechanism related to the cardiovascular toxicity of DOXO. The determination of vitamin K levels, such pro-inflammatory cytokines (like IL-6 and TNF- α ; which accelerate the formation of VKDPs) and the quantification of other VKDPs, such as osteocalcin and growth arrest-specific 6 (Gas6) and Gla-rich protein (GRP), is strongly encouraged in future prospective clinical studies including patients with breast cancer under DOXO treatment.

This study presents limitations, such as a sectional study of a single center, carried out with patients who undergoing chemotherapy only with DOXO. The small sample size is also an important limitation of our study. Moreover, as the biomarkers were not evaluated before the treatment, the cancer itself could influence some results. Consequently, further

longitudinal studies for validation of these markers, with a huge population, should be conducted in order to evaluate their performance to monitoring cardiovascular changes caused by DOXO chemotherapy.

Our result is preliminary one, but it could contribute to a better understanding of the underlying mechanisms of doxorubicin-cardiotoxicity based, in addition to suggesting potential markers for this diagnosis, since there is a lack of clinical and laboratory biomarkers in this context.

New biomarkers such as GDF-15, FABP3, FABP4, sCD14 and ucMGP could be related to cardiovascular changes in breast cancer patients treated with DOXO, a cardiotoxic chemotherapy.

Acknowledgments

KBG are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq for the research fellowship. RMCP is grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES for the research fellowship. Luciana Maria Silva and Heloisa Helena M. Oliveira by the technical support.

Research funding

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Author contributions

All authors have accepted responsibility for the entire content of this manuscript and approved its submission.

Competing interests

The authors have no relevant interest to disclose.

Informed consent

Informed consent was obtained from all individuals included in this study.

Ethical approval

This study was approved by the UFMG Research Ethics Committee (n. 38538714.20000.5149) and FHEMIG Ethics Committee (n. 54376216.0.0000.5119), according to World Medical Association Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from all individuals for being included in the study.

References

1. Mansur A de P, Favarato D. Cardiovascular and Cancer Death Rates in the Brazilian Population Aged 35 to 74 Years, 1996-2017. *Arq Bras Cardiol.* 2021 Aug;117(2):329–40.
2. Mehta LS, Watson KE, Barac A, Beckie TM, Bittner V, Cruz-Flores S, et al. Cardiovascular Disease and Breast Cancer: Where These Entities Intersect: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation.* 2018;137(8):e30–66.
3. Maki Y, Sueta D, Ishii M, Yamanouchi Y, Fujisue K, Yamanaga K, et al. Associations of cardiovascular risk factors with survival outcomes in a cancer registration: Findings from the KUMAMON registry. *Medicine (Baltimore).* 2021 Nov;100(47):e27921.
4. Leiva O, AbdelHameid D, Connors JM, Cannon CP, Bhatt DL. Common Pathophysiology in Cancer, Atrial Fibrillation, Atherosclerosis, and Thrombosis: JACC: CardioOncology State-of-the-Art Review. *JACC CardioOncology* [Internet]. 2021;3(5):619–34. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666087321002532>
5. Albain K, Anderson S, Arriagada R, Barlow W, Bergh J, Bliss J, et al. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: Meta-analyses of long-term outcome among 100 000 women in 123 randomised trials. *Lancet*

- [Internet]. 2012;379(9814):432–44. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61625-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61625-5)
6. Demissei BG, Hubbard RA, Zhang L, Smith AM, Sheline K, McDonald C, et al. Changes in Cardiovascular Biomarkers With Breast Cancer Therapy and Associations With Cardiac Dysfunction. *J Am Heart Assoc*. 2020 Jan;9(2):e014708.
 7. Rüger AM, Schneeweiss A, Seiler S, Tesch H, van Mackelenbergh M, Marmé F, et al. Cardiotoxicity and Cardiovascular Biomarkers in Patients With Breast Cancer: Data From the GeparOcto-GBG 84 Trial. *J Am Heart Assoc*. 2020 Dec;9(23):e018143.
 8. Pestana RMC, Duarte RCF, Alves MT, de Oliveira AN, Oliveira HHM, Soares CE, et al. Hemostatic status in women with breast cancer and cardiotoxicity associated to doxorubicin-based chemotherapy - A one-year follow-up study. *Thromb Res* [Internet]. 2022 Mar 1;211:56–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2022.01.009>
 9. Herrmann (Chair) J, Lenihan (Co-chair) D, Armenian S, Barac A, Blaes A, Cardinale D, et al. Defining cardiovascular toxicities of cancer therapies: an International Cardio-Oncology Society (IC-OS) consensus statement. *Eur Heart J* [Internet]. 2022 Jan 21;43(4):280–99. Available from: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab674>
 10. López-Sendón J, Álvarez-Ortega C, Zamora Auñón P, Buño Soto A, Lyon AR, Farmakis D, et al. Classification, prevalence, and outcomes of anticancer therapy-induced cardiotoxicity: The CARDIOTOX registry. *Eur Heart J*. 2020;41(18):1720–9.
 11. Pradhan NM, Mullin C, Poor HD. Biomarkers and Right Ventricular Dysfunction. *Crit Care Clin*. 2020;36(1):141–53.
 12. Cardinale D, Colombo A, Bacchiani G, Tedeschi I, Meroni CA, Veglia F, et al. Early Detection of Anthracycline Cardiotoxicity and Improvement With Heart Failure Therapy. *Circulation* [Internet]. 2015 Jun 2;131(22):1981–8. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013777>

13. Sjöberg E, Meyrath M, Chevigné A, Östman A, Augsten M, Szpakowska M. The diverse and complex roles of atypical chemokine receptors in cancer: From molecular biology to clinical relevance and therapy. *Adv Cancer Res.* 2020;145:99–138.
14. Korbecki J, Bajdak-Rusinek K, Kupnicka P, Kapczuk P, Simińska D, Chlubek D, et al. The Role of CXCL16 in the Pathogenesis of Cancer and Other Diseases. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Mar 28;22(7):3490. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33800554>
15. Wang J, Lo JC, Foster A, Yu P, Chen HM, Wang Y, et al. The regulation of T cell homeostasis and autoimmunity by T cell-derived LIGHT. *J Clin Invest* [Internet]. 2001 Dec;108(12):1771–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11748260>
16. Skeate JG, Otsmaa ME, Prins R, Fernandez DJ, Da Silva DM, Kast WM. TNFSF14: LIGHTing the Way for Effective Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* [Internet]. 2020 May 15;11:922. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32499782>
17. Wischhusen J, Melero I, Fridman WH. Growth/Differentiation Factor-15 (GDF-15): From Biomarker to Novel Targetable Immune Checkpoint .
18. Bledsoe G, Crickman S, Mao J, Xia C-F, Murakami H, Chao L, et al. Kallikrein/kinin protects against gentamicin-induced nephrotoxicity by inhibition of inflammation and apoptosis. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 2006 Mar 1;21(3):624–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfi225>
19. Cranenburg ECM, Vermeer C, Koos R, Boumans M-L, Hackeng T-M, Bouwman FG, et al. The Circulating Inactive Form of Matrix Gla Protein (ucMGP) as a Biomarker for Cardiovascular Calcification. *J Vasc Res* [Internet]. 2008;45(5):427–36. Available from: <https://www.karger.com/DOI/10.1159/000124863>
20. Mayer OJ, Seidlerová J, Bruthans J, Filipovský J, Timoracká K, Vaněk J, et al. Desphospho-uncarboxylated matrix Gla-protein is associated with mortality risk in

- patients with chronic stable vascular disease. *Atherosclerosis*. 2014 Jul;235(1):162–8.
21. Wu Z, Zhang Z, Lei Z, Lei P. CD14: Biology and role in the pathogenesis of disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2019 Aug;48:24–31.
 22. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*. 1990 Sep;249(4975):1431–3.
 23. Thumser AE, Moore JB, Plant NJ, Storch J, Thumser AE. Fatty acid binding proteins: tissue-specific functions in health and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* [Internet]. 2014 Oct;17(2):32679–83. Available from: https://journals.lww.com/co-clinicalnutrition/Fulltext/2014/03000/Fatty_acid_binding_proteins__tissue_specific.4.aspx
 24. Zhen EY, Berna MJ, Jin Z, Pritt ML, Watson DE, Ackermann BL, et al. Quantification of heart fatty acid binding protein as a biomarker for drug-induced cardiac and musculoskeletal necroses. *PROTEOMICS – Clin Appl* [Internet]. 2007 Jul 1;1(7):661–71. Available from: <https://doi.org/10.1002/prca.200700006>
 25. Mion MM, Novello E, Altinier S, Rocco S, Zaninotto M, Plebani M. Analytical and clinical performance of a fully automated cardiac multi-markers strategy based on protein biochip microarray technology. *Clin Biochem* [Internet]. 2007;40(16):1245–51. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009912007003062>
 26. Niizeki T, Takeishi Y, Arimoto T, Takabatake N, Nozaki N, Hirono O, et al. Heart-Type Fatty Acid-Binding Protein Is More Sensitive Than Troponin T to Detect the Ongoing Myocardial Damage in Chronic Heart Failure Patients. *J Card Fail* [Internet]. 2007;13(2):120–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S107191640601222X>

27. Furuhashi M. Fatty Acid-Binding Protein 4 in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *J Atheroscler Thromb*. 2019 Mar;26(3):216–32.
28. D’Agostino RBS, Vasan RS, Pencina MJ, Wolf PA, Cobain M, Massaro JM, et al. General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2008 Feb;117(6):743–53.
29. Simões R, Silva LM, de Oliveira AN, Alves MT, Pestana RMC, de Souza IDP, et al. Identification of Clinical and Laboratory Variables Associated with Cardiotoxicity Events Due to Doxorubicin in Breast Cancer Patients: A 1-Year Follow-Up Study. *Cardiovasc Toxicol* [Internet]. 2021 Feb 25;21(2):106–14. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12012-020-09600-7>
30. Wollert KC, Kempf T, Wallentin L. Growth Differentiation Factor 15 as a Biomarker in Cardiovascular Disease. *Clin Chem* [Internet]. 2017 Jan 1;63(1):140–51. Available from: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2016.255174>
31. Blanchette-Farra N, Kita D, Konstorum A, Tesfay L, Lemler D, Hegde P, et al. Contribution of three-dimensional architecture and tumor-associated fibroblasts to hepcidin regulation in breast cancer. *Oncogene* [Internet]. 2018;37(29):4013–32. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0243-y>
32. Schopfer DW, Ku IA, Regan M, Whooley MA. Growth differentiation factor 15 and cardiovascular events in patients with stable ischemic heart disease (The Heart and Soul Study). *Am Heart J* [Internet]. 2014;167(2):186-192.e1. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002870313006662>
33. Putt M, Hahn VS, Januzzi JL, Sawaya H, Sebag IA, Plana JC, et al. Longitudinal Changes in Multiple Biomarkers Are Associated with Cardiotoxicity in Breast Cancer Patients Treated with Doxorubicin, Taxanes, and Trastuzumab. *Clin Chem*. 2015 Sep;61(9):1164–72.

34. Tsakogiannis D, Kalogera E, Zagouri F, Zografos E, Balalis D, Bletsas G. Determination of FABP4, RBP4 and the MMP-9/NGAL complex in the serum of women with breast cancer. *Oncol Lett.* 2021 Feb;21(2):85.
35. Prentice KJ, Saksi J, Hotamisligil GS. Adipokine FABP4 integrates energy stores and counterregulatory metabolic responses. *J Lipid Res.* 2019 Apr;60(4):734–40.
36. Hao J, Yan F, Zhang Y, Triplett A, Zhang Y, Schultz DA, et al. Expression of Adipocyte/Macrophage Fatty Acid-Binding Protein in Tumor-Associated Macrophages Promotes Breast Cancer Progression. *Cancer Res.* 2018 May;78(9):2343–55.
37. Rawat PS, Jaiswal A, Khurana A, Bhatti JS, Navik U. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: An update on the molecular mechanism and novel therapeutic strategies for effective management. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2021;139:111708. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S075333222100490X>
38. Sayed-Ahmed MM, Al-Shabanah OA, Hafez MM, Aleisa AM, Al-Rejaie SS. Inhibition of gene expression of heart fatty acid binding protein and organic cation/carnitine transporter in doxorubicin cardiomyopathic rat model. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2010;640(1):143–9. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299910003936>
39. Rezar R, Jirak P, Gschwandtner M, Derler R, Felder TK, Haslinger M, et al. Heart-Type Fatty Acid-Binding Protein (H-FABP) and its Role as a Biomarker in Heart Failure: What Do We Know So Far? *J Clin Med* [Internet]. 2020 Jan 7;9(1):164. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31936148>
40. Conway K, Edmiston SN, May R, Kuan PF, Chu H, Bryant C, et al. DNA methylation profiling in the Carolina Breast Cancer Study defines cancer subclasses differing in

- clinicopathologic characteristics and survival. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2014;16(5):450. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13058-014-0450-6>
41. Lippi G, Mattiuzzi C, Cervellin G. Critical review and meta-analysis on the combination of heart-type fatty acid binding protein (H-FABP) and troponin for early diagnosis of acute myocardial infarction. *Clin Biochem* [Internet]. 2013;46(1):26–30. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009912012005711>
 42. Caballero RM, Antolin JMS, Garcia IAG, Garcia JMM, Ruigomez AC, Landaluce CG, et al. INCIDENCE AND PREDICTORS OF LONG TERM CARDIOTOXICITY IN ANTRACYCLINE BASED CHEMOTHERAPY IN BREAST CANCER PATIENTS. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2019;73(9, Supplement 1):942. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0735109719315499>
 43. Wu C-C, Hsu C-W, Chen C-D, Yu C-J, Chang K-P, Tai D-I, et al. Candidate serological biomarkers for cancer identified from the secretomes of 23 cancer cell lines and the human protein atlas. *Mol Cell Proteomics*. 2010 Jun;9(6):1100–17.
 44. Gadducci A, Ferdeghini M, Castellani C, Annicchiarico C, Galletti O, Prontera C, et al. Serum levels of tumor necrosis factor (TNF), soluble receptors for TNF (55- and 75-kDa sTNFr), and soluble CD14 (sCD14) in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 1995 Aug;58(2):184–8.
 45. Cowan DB, Poutias DN, Del Nido PJ, McGowan FXJ. CD14-independent activation of cardiomyocyte signal transduction by bacterial endotoxin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000 Aug;279(2):H619–29.
 46. Bas S, Gauthier BR, Spenato U, Stingelin S, Gabay C. CD14 is an acute-phase protein. *J Immunol*. 2004 Apr;172(7):4470–9.
 47. Yoshimura K, Takeuchi K, Nagasaki K, Ogishima S, Tanaka H, Iwase T, et al.

- Prognostic value of matrix Gla protein in breast cancer. *Mol Med Rep.* 2009;2(4):549–53.
48. Zwakenberg SR, Burgess S, Sluijs I, Weiderpass E, Beulens JWJ, van der Schouw YT. Circulating phylloquinone, inactive Matrix Gla protein and coronary heart disease risk: A two-sample Mendelian Randomization study. *Clin Nutr.* 2020 Apr;39(4):1131–6.
 49. Shioi A, Morioka T, Shoji T, Emoto M. The Inhibitory Roles of Vitamin K in Progression of Vascular Calcification. *Nutrients* [Internet]. 2020 Feb 23;12(2):583. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32102248>
 50. Rapp N, Brandenburg VM, Kaesler N, Bakker SJL, Stöhr R, Schuh A, et al. Hepatic and Vascular Vitamin K Status in Patients with High Cardiovascular Risk. *Nutrients.* 2021 Oct;13(10).

Table 1. Breast cancer clinical characteristics prior DOXO-chemotherapy.

Variable	Breast Cancer Patients
Age (years)	50.2 ± 11.3
BMI (kg/m ²)	27.91 ± 5.9
Dose DOXO (mg/m ²)	380.6 [360.0 – 400.0]
Diabetes mellitus , yes (n, %)	3 (8.8)
Hypertension , yes (n, %)	11 (32.4)
Total cholesterol (mg/dL)	215.97 ± 30.35
HDL-cholesterol (mg/dL)	54.50 [48.00 – 59.75]
LDL-cholesterol (mg/dL)	130.67 ± 27.67
Framingham cardiovascular risk , n (%)	
Low risk	15 (44.1)
Intermediate risk	10 (29.4)
High risk	9 (26.5)
LVEF (%)	66.97 ± 2.33
Histological diagnosis , n (%)	
Invasive ductal carcinoma	30 (88.2)
Lobular carcinoma	3 (8.8)
Special types	1 (2.9)
Molecular type	
HER2+	18 (52.9)
Luminal	12 (35.3)
Triple negative	4 (11.8)

BMI: body mass index; DOXO: doxorubicin; LVEF: left ventricular ejection fraction

Table 2. Cardiovascular biomarkers according to the molecular subtype in breast cancer patients.

Biomarkers	Luminal (12, 35.3%)	HER2+ (18; 52.9%)	Triple negative (4; 11.8%)	p-value
CXCL-16 (pg/mL)	1.35 [0.96 - 1.59]	1.52 [1.25 - 2.53]	1.38 [1.03 - 2.52]	0.370
FABP3 (pg/mL)	1.36 [1.15 - 12.89]	1.21 [0.92 - 1.80]	0.63 [0.09 - 15.26]	0.444
FABP4 (pg/mL)	0.21 [0.06 - 0.67]	0.86 [0.14 - 1.32]	0.82 [0.10 - 17.05]	0.248
LIGHT (pg/mL)	0.06 [0.02 - 1.21]	0.86 [0.06 - 46.41]	0.42 [0.12 - 0.92]	0.203
GDF-15 (ng/mL)	11.38 [3.82 - 15.15]	14.75 [11.10 - 19.54]	24.79 [17.92 - 1899.90]	0.030 [†]
sCD14 (pg/mL)	3.387 [0.026 - 5.574]	4.098 [1.362 - 5.031]	0.021 [0.005 - 4.767]	0.398
ucMGP (ng/mL)	0.09 [0.05 -18.93]	0.15 [0.09 - 0.29]	7.97 [0.06 - 15.87]	0.957

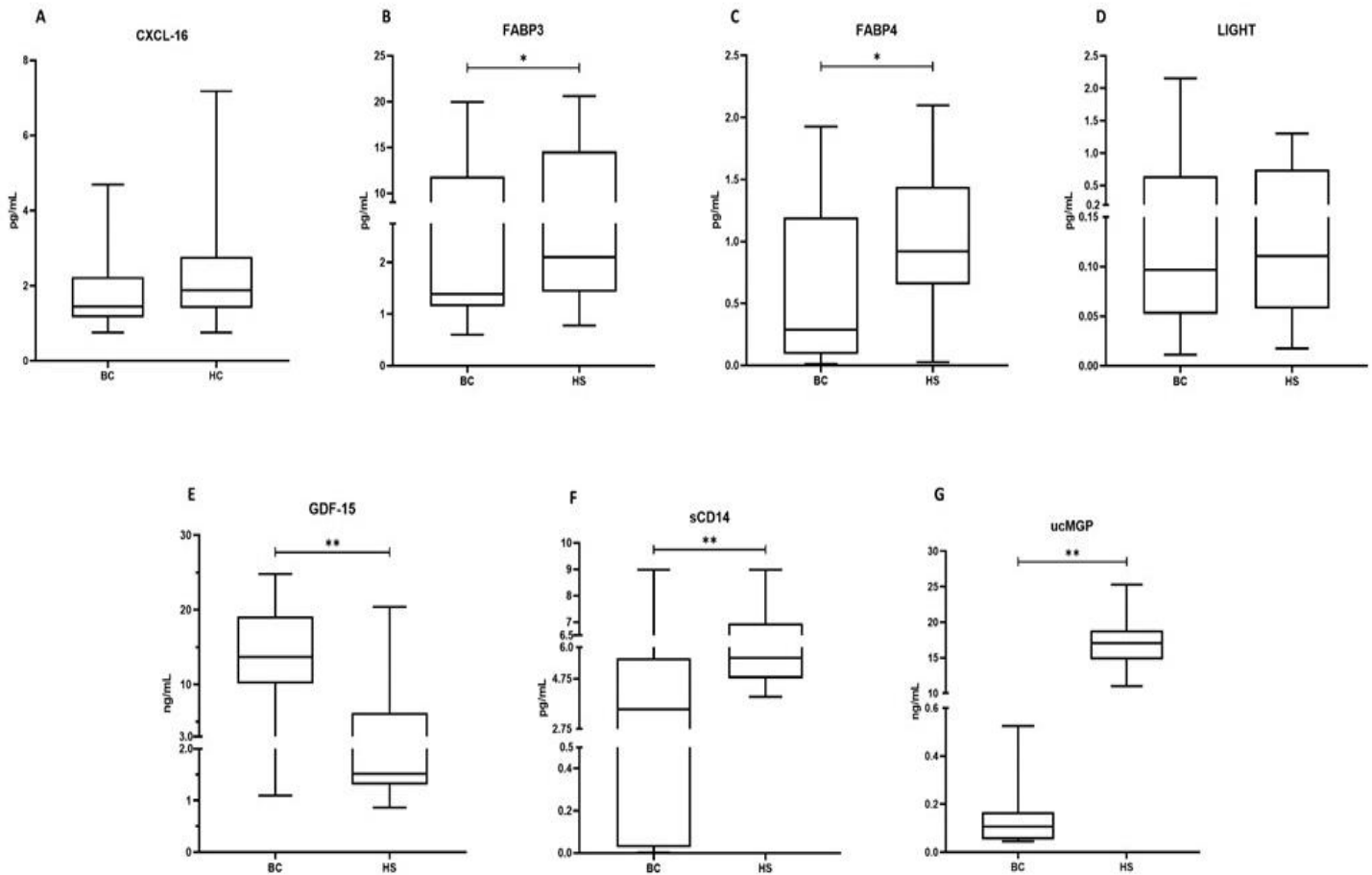
CXCL-16: C-X-C motif ligand 16; FABP3: fatty acid binding protein 3; FABP4: fatty acid binding protein 4; LIGHT: tumor necrosis factor superfamily member 14/TNFSF14; GDF-15: Growth/differentiation factor 15; sCD14: soluble form of CD14; ucMGP: uncarboxylated Matrix Gla-Protein. [†] Non-significant after Bonferroni correction.

Table 3. Cardiovascular biomarkers according to Framingham cardiovascular risk.

Biomarkers	Low risk	Intermediate risk	High risk	p-value
CXCL-16 (pg/mL)	1.34 [1.19 – 1.90]	1.40 [0.96 – 1.72]	2.32 [1.43 – 2.83]	0.101
FABP3 (pg/mL)	1.00 [0.59 – 1.27]	1.37 [1.14 – 12.21]	11.37 [1.06 – 19.54]	0.022 [†]
FABP4 (pg/mL)	0.15 [0.08 – 0.62]	1.18 [0.48 – 1.41]	0.84 [0.08 – 1.41]	0.096
LIGHT (pg/mL)	0.41 [0.06 – 35.08]	0.06 [0.02 – 0.55]	4.35 [0.16 – 25.33]	0.115
GDF-15 (ng/mL)	11.74 [1.72 – 15.66]	14.91 [11.82 – 19.75]	17.53 [11.82 – 24.02]	0.066
sCD14 (pg/mL)	5.18 [3.51 – 6.78]	0.28 [0.02 – 5.23]	2.24 [0.47 – 4.52]	0.080
ucMGP (ng/mL)	0.16 [0.09 – 14.07]	0.88 [0.05 – 14.05]	0.11 [0.06 – 0.36]	0.620

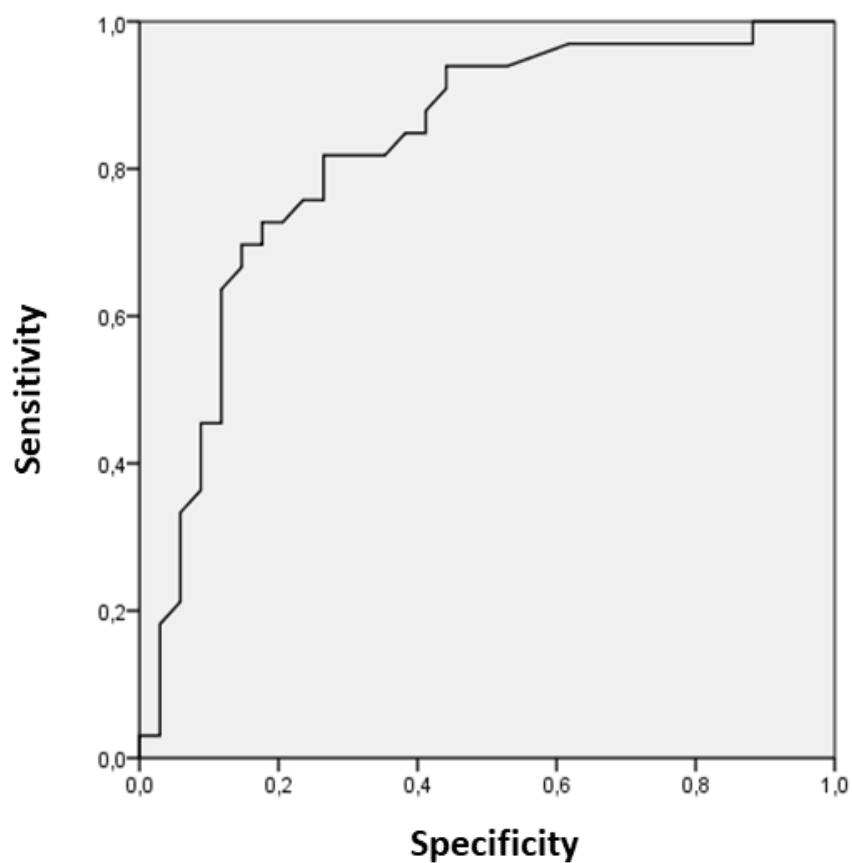
CXCL-16: C-X-C motif ligand 16; FABP3: fatty acid binding protein 3; FABP4: fatty acid binding protein 4; LIGHT: tumor necrosis factor superfamily member 14/TNFSF14; GDF-15: Growth/differentiation factor 15; sCD14: soluble form of CD14; ucMGP: uncarboxylated Matrix Gla-Protein. [†] No-significant after Bonferroni correction.

Figure 1. Cardiovascular markers comparing breast cancer patients and control subjects.



CXCL-16: C-X-C motif ligand 16; FABP3: fatty acid binding protein 3; FABP4: fatty acid binding protein 4; LIGHT: tumor necrosis factor superfamily member 14/TNFSF14; GDF-15: Growth/differentiation factor 15; sCD14: soluble form of CD14; ucMGP: uncarboxylated Matrix Gla-Protein; BC: breast cancer patients; HS: healthy control subjects * Significant ($p < 0.05$). ** Significant ($p < 0.001$).

Figure 2. ROC curve for GDF-15 levels considering the clinical diagnosis - breast cancer treated with doxorubicin x control group.



7. ARTIGO 4

Manuscrito preparado para submissão no Journal of Molecular and Cellular Cardiology

Short communication

Microparticles and cardiotoxicity secondary to doxorubicin-based chemotherapy in breast cancer patients: a cohort study.

Rodrigo M. C. Pestana^{1,2}, Andréa Teixeira-Carvalho³, Luara Isabela dos Santos³, Angélica N. de Oliveira⁴, Cintia E. Soares⁵, Adriano de P. Sabino⁶, Ricardo Simões^{4,5,6}, Karina B. Gomes^{1,6*}

1 – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

2 – Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil.

3 – Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Instituto René Rachou, Belo Horizonte, MG, Brazil

4 – Instituto de Hipertensão, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

5 – Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

6 – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Abbreviations:

CardioMPs: MPs derived from cardiomyocytes (marked with anti-caveolin3-AlexaFluor647); **DOXO:** doxorubicin; **DOXO-cardiotoxicity:** cardiotoxicity secondary to doxorubicin-based chemotherapy; **EMPs:** MPs derived from endothelial cells (marked with anti-CD51/61-FITC); **MPs:** microparticles; **PMPs:** MPs derived from platelets (marked with anti-CD41a-PE-Cy7); **PS:** phosphatidylserine; **T0:** baseline follow-up point (prior to DOXO-chemotherapy); **T1:** first follow up point (out up to 7 days after the last DOXO-chemotherapy cycle); **T2:** last follow-up point (at 12 months after the last DOXO-chemotherapy cycle); **TF:** tissue factor; **TFMPs:** MPs that express tissue factor in surface (marked with anti-CD142-PE); **Total-MPs:** MPs marked with AnnexinV-eFluor450

*Corresponding author:

Karina Braga Gomes, PhD.

Department of Clinical and Toxicological Analyses - School of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais. Presidente Antônio Carlos Avenue, 6627 – Pampulha. Belo Horizonte, Minas Gerais – Brazil. Zip code: 31270-901. Phone number: +55 (31) 3409-6895. E-mail: karinabgb@gmail.com. ORCID: 0000-0002-6870-2063.

Abstract

Doxorubicin (DOXO)-cardiotoxicity is a limiting factor for breast cancer chemotherapy. The relationship of microparticles (MPs) and cardiotoxicity remains unclear. MPs can be released under varying physiological and physiopathological conditions. Thereby, this study aimed to assess MPs derived from cardiomyocytes, endothelial cells, platelets and that expresses tissue factor in women with breast cancer undergoing DOXO-based chemotherapy, with or without cardiotoxicity in a one-year follow-up. We observed that MPs count fluctuate before and after chemotherapy in cardiotoxicity group and cardiomyocytes-MPs count presented higher measurement in this group at the baseline and after the last DOXO-cycle. Our results suggest that MPs could be associated to cardiotoxicity due to DOXO treatment in breast cancer patients.

Keywords:

Breast cancer; doxorubicin; cardiotoxicity; microparticles

1 – Introduction

Breast cancer is the most common cancer in women worldwide and the fifth leading cause of cancer mortality [1]. Doxorubicin (DOXO) is an anthracycline and one of the main drugs used in breast cancer chemotherapy. However, its use is limited due to the cumulative and dose-dependent cardiotoxicity. Several mechanisms of anthracycline cardiotoxicity have been studied, such as induction of apoptosis, and lipid bilayer damage [2].

Microparticles (MPs) are derived from plasma membrane, delimited by a lipid bilayer and cannot replicate. Cells can generate and release MPs by several physiological and pathophysiological mechanisms or stimuli, during cellular differentiation or senescence, exposure to high shear stress, apoptosis or upon pro-inflammatory or pro-thrombotic stimulations. The release of MPs from the cells is observed following an increase in intracellular calcium, thus changing the positions of phospholipids, inverting phosphatidylserine (PS) from the inside to the outside of the membrane [3,4].

MPs are stable in extracellular environment and are found in abundance in peripheral blood. In addition, they carry proteins, lipids, nucleic acids, and other molecules that reflect their tissues of origin. These characteristics enable MPs to be studied in pathophysiological investigation and as disease biomarkers [5].

Endothelial impairment is related to DOXO-cardiotoxicity mechanism [6], and recently we showed that hemostatic changes is also associated with cardiotoxicity in breast cancer women under DOXO treatment[7]. In this context, the aim of this study was to evaluate MPs derived from endothelial cells, platelets, cardiomyocytes and those that express tissue factor (TF) in surface and their relationship with DOXO-cardiotoxicity in breast cancer women.

2 – Methods

2.1 – Study characterization

This is a cohort study with 80 women (≥ 18 years old) with clinical and histopathology diagnosis of breast cancer, indicated for the neoadjuvant DOXO- chemotherapy.

The patients were recruited in an outpatient oncology clinic of Alberto Cavalcanti Hospital (Belo Horizonte, Brazil), from 2015 to 2018. We prospectively evaluated the MPs derived from cardiomyocytes (CardioMPs), endothelial cells (EMPs), platelets (PMPs) and that express tissue factor (TFMPs). All patients previously signed the informed consent form and this study was approved by the Federal University of Minas Gerais Research Ethics Committee (n. 38538714.20000.5149) and FHEMIG Ethics Committee (n. 54376216.0.0000.5119), according to World Medical Association Declaration of Helsinki.

Patients with the following conditions were not included: presence of serious or previous heart disease with impaired left ventricular ejection fraction (LVEF $<50\%$), moderate to severe hepatic or renal dysfunction, neuro-degenerative diseases, pregnancy, hospitalized patients or life expectancy < 3 months, chemotherapy or radiotherapy prior to study or under anticoagulant or antiplatelet therapy.

For characterization of cardiotoxicity, we used the criteria defined by López-Sendón et al. [8], which was defined by the occurrence of new myocardial dysfunction (even asymptomatic), including LVEF $<50\%$ or 10% reduction on LVEF after the treatment; or increase in troponin I (cTnI) and N-terminal type B natriuretic pro-peptide (NT-proBNP) levels post-treatment. cTnI and NT-proBNP were performed by chemiluminescence immunoassay in Vitros 5600[®] (OrthoClinical Diagnostics, Illkirch-Graffenstaden, France) on serum samples. Patients that died during the study (three just the end of DOXO therapy and four one year after) were maintained and the absence of any time point was considered as missing data.

2.2 –Data and samples collection

This cohort consisted of a follow-up in three time-points: T0 (prior to DOXO-chemotherapy), T1 (out up to 7 days after the last DOXO-chemotherapy cycle) and the T2 (at 12 months after the last DOXO-chemotherapy cycle). The clinical and demographic data were obtained by consulting the oncology clinic records. During the follow-up, none of the patients underwent surgery or received blood or platelet transfusions.

At each follow-up point (T0, T1 and T2) a cardiologist performed the clinical-cardiological evaluation of the patients, including echocardiographic imaging exams: Echocardiography and Doppler, color, two-dimensional (Echo-2D), including tissue mode with Vivid S6 echocardiographic (GE Medical Systems Healthcare®, Tirat Carmel, Israel), was performed following the American Society of Echocardiography (ASE) recommendations [9].

Fasting blood collection was realized at each follow-up point. Two venous blood tubes with 4mL were collected, the first-one containing 0.106 mol/L of sodium citrate and one without additive. For serum preparation, the tube without additive was centrifuged at 3000×g for 15 min, up to two hours after blood collection. Platelet-poor plasma (PPP) were obtained by double centrifugation at 3000×g for 15 min at room temperature, in same conditions. The plasma and serum samples were distributed in aliquots and immediately stored at -80 °C until assayed.

2.3 – Experimental procedures for MPs analysis

Analysis of MPs in plasma was performed by flow cytometry as previously described by Campos et al. [10]. The MPs were assessed in CytoflexS® (Beckman Coulter Inc, Brea, USA). A panel phenotyping was customized with the objective of carrying out a multiparametric analysis, performing the analysis of MPs in a single tube. Antibodies and fluorochromes used in this panel phenotyping were: anti-caveolin3-AlexaFluor647 (cardiomyocytes), CD51/61-FITC (endothelial cells), CD142-PE (tissue factor), CD41a-PE-Cy7 (platelets). AnnexinV-eFluor450 was used to bidding phosphatidylserine (PS), global marker for MPs. All antibodies-fluorochromes were from Thermo Fisher Scientific® (San Diego, USA).

The PPP samples were thawed at 37°C. and then, they were centrifuged at high speed (13,000×g for 3 min). After obtaining the platelet-free plasma (PFP), the supernatant was aspirated and diluted 1:3 in citrate phosphate buffered saline (PBS) containing heparin. The diluted sample was centrifuged at 15,000×g for 90 min at 15°C (at lower deceleration). The resultant MPs pellet was then resuspended in 10× annexin V binding buffer Thermo Fisher Scientific® (San Diego, USA).

The cytometer was programmed to operate at a high flow rate setting for 60 seconds for each sample (50.000 events, each). The number of MPs/μL of plasma was calculated as described by Campos et al. [10]: $\text{MPs}/\mu\text{L} = (N \times 400) / (60 \times 100)$, in which N is the number of events, 400 is the total volume of the tube before analysis, 60 is the sample volume analyzed, and 100 is the original volume of MPs suspension used to perform the phenotyping protocol. Calibration microbeads (The Flow Cytometry Submicron Particle Size Reference Kit, by Thermo Fisher Scientific®), which provides six sizes of green-fluorescent beads (ranging in diameter from 0.02 μm to 2.0 μm) were used to identify MPs according to their sizes.

2.4 – Statistical analysis

Statistical analyses were performed in the software IBM® SPSS® Statistics software (for Windows®; Chicago, Illinois, USA, version 21). Categorical variables were presented as n (%). Shapiro-Wilk test was applied to verify the normality of quantitative variables, which were presented as mean ± SD or median (25th - 75th percentiles). T-Students test and ANOVA One-Way or Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were used to determine differences between two and three groups, respectively. Friedman test was applied to verify the differences of MPs count between the time-points within groups. The Receiver Operating

Characteristic (ROC) curve analysis was constructed to assess the performance of MPs as discriminatory biomarkers for the cardiotoxicity outcome, and the area under the curve (AUC) was calculated. Significance adopted was 5% (p value <0.05).

3 – Results and Discussion

Breast cancer patients presented a mean age of 50.31 ± 1.42 years, dose-median of DOXO was 360.0 (380.0 - 417.0) mg/m². Cardiotoxicity was observed in 27 (33.7%) patients and BMI was lower (p=0.028) in cardiotoxicity-group (27.3 ± 4.8 kg/m²) than non-cardiotoxicity group (30.1 ± 6.0 kg/m²). The prevalent histological type was ductal carcinoma, observed in 72 (90%) individuals, 6 (7.5%) have lobular carcinoma and 2 (2.5%) especial types. The predominant molecular type was HER2⁺, observed in 34 (42.5%) patients, luminal type in 25 (31.3%) and triple negative in 20 (25.0%) breast cancer women. Age, dose of DOXO, histological and molecular type frequencies were not different between cardiotoxicity and no-cardiotoxicity groups (all p> 0.05, data not shown).

Patients with breast cancer and cardiotoxicity showed higher count of (1) total-MPs at T0 (p=0.034); (2) CardioMPs, at T0 (p=0.009) and at T1 (p=0.034); (3) TFMPs at T0 (p=0.011) and lower count of EMPs at T0 (p=0.012) and at T1 (p=0.016) compared to no-cardiotoxicity group (**Table 1**).

CardioMPs at T0 presented the most significant median difference between the groups. Therefore, we constructed the ROC curve in order to calculate the accuracy of this potential biomarker in discriminating DOXO-cardiotoxicity. Area under the curve was 0.721 (95% CI 0.575 – 0.866; p=0.009), **Figure 1**.

The MPs count are similar between histological and molecular types, as well as the longitudinal analysis did not indicate any difference for the MPs count between the follow-up points within the groups (cardiotoxicity and no-cardiotoxicity) (all p>0.05, data not shown). Platelet-, monocyte-, and endothelial-derived MPs are the most frequently detected MPs in cancer patients [11]. Recently, it was demonstrated by Zhang et al. [12] that neoadjuvant chemotherapy (with DOXO and cyclophosphamide) increases the expression of PS in chemotherapy-induced breast cancer cell-derived MPs (BCMPs). They also demonstrated that these vesicles were associated with an increase in procoagulant activity. They defined a term “PS+ BCMPs Storm”, which results in a hypercoagulable state, a high extravasation state, and increases the risk of metastasis and death.

PS exposed in cell surface plays a signaling role on dead cells, and creates a scaffold for blood-clotting factors on activated platelets [13]. In our study, we found higher count of Total-MPs (all MPs that can be marked with Annexin V, ie, PS+) in cardiotoxicity group at T0. We can assume that these patients may have a potentially hypercoagulable state prior to chemotherapy.

In a study realized by Aharon et al. [14], extracellular vesicles (EVs) were isolated from the blood sample of breast cancer patients treated by chemotherapy and from control group. In some patients, they also evaluated samples obtained 24 hours after chemotherapy treatment. They found that percentage of EVs derived from endothelial cells were higher in breast cancer patients compared to control group. However, no significant difference was found between the patients before or at the end of the chemotherapy, similarly with our results related to EMPs. Therefore, no difference at the T2 was observed between the groups, but curiously, higher EMPs count was observed at T0 and T1 in non-cardiotoxicity group. EMPs are related to thrombogenicity, a common finding in cancer, however our results suggest that DOXO-cardiotoxicity mechanism maybe is not associated to endothelial impairment.

Tesselaar et al. [15] showed that MPs associated to TF activity have a crucial role in the pathogenesis of thrombosis in cancer patients. In our study, patients with cardiotoxicity had higher count of TFMPs at the baseline. This suggests that these patients may have an accentuated prothrombotic state before chemotherapy. In a previous study, we described

changes in hemostatic parameters of breast cancer patients under DOXO-chemotherapy. Patients with cardiotoxicity had higher peak of thrombin before DOXO-chemotherapy compared to non-cardiotoxicity group [7]. These two evidences together supports the possible role of MPs in hypercoagulable state and in cardiotoxicity, two important outcomes in the chemotherapy treatment of breast cancer.

Although no differences were observed for PMPs in our study, it is known that they play an important role in hemostasis and cancer pathophysiology in breast cancer patients. In a case-control study, Haghbin et al. [16] found that PMPs were higher in breast cancer patients compared to healthy controls. They also shown that PMPs increased levels with augmenting tumor size, and they were highest in patients with metastasis and lymph node involvement. Similar results were found by Chaari et al. [17] in another case-control study, they shown that breast cancer had higher thrombin generation and PMPs. A substantial experimental study shown a platelet procoagulant activity was induced by DOXO. They demonstrated that treatment with DOXO substantially increased the number of PS-positive platelets and MPs generation [18]. Chaari et al. [17] demonstrated that blood hypercoagulability in breast cancer patients has been shown to be characterized by a marked increase in procoagulant PMPs, increased thrombin generation and increased fibrin degradation. In addition, disease stage, chemotherapy administration, and time elapsed since diagnosis have a significant but variable impact on these components.

Several mechanisms of DOXO-induced cardiotoxicity have been hypothesized. DOXO can cause cardiomyocyte death by an autophagic processes, in which the cardiomyocytes forms a transitory multivesicular body derived from lysosome, that later fuses with the cell membrane and finally is released [19]. Usually, cardiomyocytes are not considered as typical secretory cells, however, they can release MPs, especially due cellular activation, injury, hypoxia, apoptosis and inflammation [20]. This observation could explain the higher CardioMPs counts after chemotherapy in cardiotoxicity group (T1) observed in our study. Interesting, this group also presented higher CardioMPs measurement at T0 compared to non-cardiotoxicity group, probably related to a predisposition to cardiotoxicity prior chemotherapy. It is important to highlight that the MPs formation and release are not restricted to cardiomyocytes, since cardiac telocytes can release MPs and act in paracrine communication, participating in cardiac degeneration [19,21]. Therefore, we can hypothesize that CardioMPs may be a potential biomarker to predict and monitoring DOXO-cardiotoxicity, since they have a PS+ phenotyping, which is related to hypercoagulable state.

This study has some limitations, such as the single center study and small sample size. However, these results deserve special attention due to their originality and new perspectives that can improve the elucidation of the pathophysiological mechanisms of DOXO-cardiotoxicity and its application in clinical practice. As far we know, this is first study that evaluated MPs in DOXO-cardiotoxicity and breast cancer, mainly the CardioMPs.

In conclusion, our study contributes to the efforts that have been largely dedicated to the pathophysiological elucidation of cardiac injury caused by DOXO-chemotherapy.

Acknowledgments

KBG and ATC are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq for the research fellowship. RMCP is grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES for the research fellowship.

Author contributions

All authors have accepted responsibility for the entire content of this manuscript and approved its submission. Material preparation and data collection were performed by RMCP, ANO, CES, APS, RS and KBG. Microparticles assays was performed and analyzed by RMCP, ATC and LIS. Statistical analyses were performed by RMCP and KBG. The first draft of the manuscript was written by RMCP and KBG. ATC, LIS, ANO, CES, APS, RS and

KBG reviewed the last version of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Data and material availability

The data that support these findings, including statistical analyses, reagents used, are available from the corresponding author upon request.

Research funding

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Declarations of interest: none

Informed consent

Informed consent was obtained from all individuals included in this study.

Ethical approval

This study was approved by the UFMG Research Ethics Committee (n. 38538714.20000.5149) and FHEMIG Ethics Committee (n. 54376216.0.0000.5119), according to World Medical Association Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from all individuals for being included in the study.

References

- [1] H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries., CA. Cancer J. Clin. 71 (2021) 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- [2] G. Minotti, P. Menna, E. Salvatorelli, G. Cairo, L. Gianni, Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity, Pharmacol. Rev. 56 (2004) 185–229. <https://doi.org/10.1124/pr.56.2.6>.
- [3] D.L. Daleke, Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry., J. Lipid Res. 44 (2003) 233–242. <https://doi.org/10.1194/jlr.R200019-JLR200>.
- [4] J.P.G. Sluijter, V. Verhage, J.C. Deddens, F. Van Den Akker, P.A. Doevendans, Microvesicles and exosomes for intracardiac communication, Cardiovasc. Res. 102 (2014) 302–311. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu022>.
- [5] C. Yarana, D. Carroll, J. Chen, L. Chaiswing, Y. Zhao, T. Noel, M. Alstott, Y. Bae, E. V Dressler, J.A. Moscow, D.A. Butterfield, H. Zhu, D.K. St Clair, Extracellular Vesicles Released by Cardiomyocytes in a Doxorubicin-Induced Cardiac Injury Mouse Model Contain Protein Biomarkers of Early Cardiac Injury., Clin. Cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. 24 (2018) 1644–1653. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2046>.
- [6] J.-A. Pan, H. Zhang, H. Lin, L. Gao, H.-L. Zhang, J.-F. Zhang, C.-Q. Wang, J. Gu, Irisin ameliorates doxorubicin-induced cardiac perivascular fibrosis through inhibiting endothelial-to-mesenchymal transition by regulating ROS accumulation and autophagy disorder in endothelial cells., Redox Biol. 46 (2021) 102120. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102120>.
- [7] R.M.C. Pestana, R.C.F. Duarte, M.T. Alves, A.N. de Oliveira, H.H.M. Oliveira, C.E. Soares, A. de P. Sabino, L.M. Silva, M. das Graças Carvalho, R. Simões, K.B. Gomes, Hemostatic status in women with breast cancer and cardiotoxicity associated to doxorubicin-based chemotherapy - A one-year follow-up study, Thromb. Res. 211 (2022) 56–59. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2022.01.009>.
- [8] J. López-Sendón, C. Álvarez-Ortega, P. Zamora Auñón, A. Buño Soto, A.R. Lyon, D. Farmakis, D. Cardinale, M. Canales Albendea, J. Feliu Batlle, I. Rodríguez Rodríguez, O. Rodríguez Fraga, A. Albaladejo, G. Mediavilla, J.R. González-Juanatey, A. Martínez Monzonis, P. Gómez Prieto, J. González-Costello, J.M. Serrano Antolín, R.

- Cadenas Chamorro, T. López Fernández, Classification, prevalence, and outcomes of anticancer therapy-induced cardiotoxicity: The CARDIOTOX registry, *Eur. Heart J.* 41 (2020) 1720–1729. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa006>.
- [9] S.F. Nagueh, O.A. Smiseth, C.P. Appleton, B.F. 3rd Byrd, H. Dokainish, T. Edvardsen, F.A. Flachskampf, T.C. Gillebert, A.L. Klein, P. Lancellotti, P. Marino, J.K. Oh, B.A. Popescu, A.D. Waggoner, Recommendations for the Evaluation of Left Ventricular Diastolic Function by Echocardiography: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging., *J. Am. Soc. Echocardiogr. Off. Publ. Am. Soc. Echocardiogr.* 29 (2016) 277–314. <https://doi.org/10.1016/j.echo.2016.01.011>.
- [10] F.M.F. Campos, B.S. Franklin, A. Teixeira-Carvalho, A.L.S. Filho, S.C.O. de Paula, C.J. Fontes, C.F. Brito, L.H. Carvalho, Augmented plasma microparticles during acute *Plasmodium vivax* infection., *Malar. J.* 9 (2010) 327. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-327>.
- [11] A. Janowska-Wieczorek, L.A. Marquez-Curtis, M. Wysoczynski, M.Z. Ratajczak, Enhancing effect of platelet-derived microvesicles on the invasive potential of breast cancer cells., *Transfusion.* 46 (2006) 1199–1209. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2006.00871.x>.
- [12] C. Zhang, Z. Yang, P. Zhou, M. Yu, B. Li, Y. Liu, J. Jin, W. Liu, H. Jing, J. Du, J. Tian, Z. Zhao, J. Wang, Y. Chu, C. Zhang, V.A. Novakovic, J. Shi, C. Wu, Phosphatidylserine-exposing tumor-derived microparticles exacerbate coagulation and cancer cell transendothelial migration in triple-negative breast cancer, *Theranostics.* 11 (2021) 6445–6460. <https://doi.org/10.7150/thno.53637>.
- [13] S. Nagata, J. Suzuki, K. Segawa, T. Fujii, Exposure of phosphatidylserine on the cell surface, *Cell Death Differ.* 23 (2016) 952–961. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.7>.
- [14] A. Aharon, A. Sabbah, S. Ben-Shaul, H. Berkovich, D. Loven, B. Brenner, G. Bar-Sela, Chemotherapy administration to breast cancer patients affects extracellular vesicles thrombogenicity and function, *Oncotarget.* 8 (2017) 63265–63280. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18792>.
- [15] M.E.T. TESSELAAR, F.P.H.T.M. ROMIJN, I.K. VAN DER LINDEN, F.A. PRINS, R.M. BERTINA, S. OSANTO, Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis?, *J. Thromb. Haemost.* 5 (2007) 520–527. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02369.x>.
- [16] M. Haghbin, A. Hashemi Tayer, M. Kamravan, A. Sotoodeh Jahromi, Platelet-Derived Procoagulant Microparticles as Blood-based Biomarker of Breast Cancer., *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 22 (2021) 1573–1579. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2021.22.5.1573>.
- [17] M. Chaari, I. Ayadi, A. Rousseau, E. Lefkou, P. Van Dreden, F. Sidibe, H. Ketatni, V. Galea, A. Khaterchi, R. Bouzguenda, M. Frikha, L. Ghorbal, J. Daoud, C. Kallel, M. Quinn, J. Gligorov, J.P. Lotz, M. Hatmi, I. Elalamy, G.T. Gerotziafas, Impact of breast cancer stage, time from diagnosis and chemotherapy on plasma and cellular biomarkers of hypercoagulability, *BMC Cancer.* 14 (2014) 991. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-991>.
- [18] S.H. Kim, K.M. Lim, J.Y. Noh, K. Kim, S. Kang, Y.K. Chang, S. Shin, J.H. Chung, Doxorubicin-induced platelet procoagulant activities: An important clue for chemotherapy-associated thrombosis, *Toxicol. Sci.* 124 (2011) 215–224. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr222>.
- [19] J.J. Bartlett, P.C. Trivedi, T. Pulinilkunnil, Autophagic dysregulation in doxorubicin cardiomyopathy, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 104 (2017) 1–8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2017.01.007>.
- [20] D.A. Chistiakov, A.N. Orekhov, Y. V Bobryshev, Cardiac Extracellular Vesicles in

- Normal and Infarcted Heart., *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016).
<https://doi.org/10.3390/ijms17010063>.
- [21] E.T. Fertig, M. Gherghiceanu, L.M. Popescu, Extracellular vesicles release by cardiac telocytes: electron microscopy and electron tomography., *J. Cell. Mol. Med.* 18 (2014) 1938–1943. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12436>.

MPs/ μ L	Cardiotoxicity group (n= 27; 33,8%)	No-cardiotoxicity group (n= 53; 66,3%)	p-value
Total-MPs (T0)	53200.00 (39650.00 – 65100.00)	36900.00 (6651.50 – 47325.00)	0.034*
Total-MPs (T1)	46800.00 (40500.00 – 61650.00)	40700.00 (7069.85 – 46525.00)	0.263
Total-MPs (T2)	44700.00 (40650.00 – 61550.00)	35250.00 (6789.60 – 50000.00)	0.101
CardioMPs (T0)	51600.00 (38450.00 – 65100.00)	35300.00 (5339.20 – 47600.00)	0.009*
CardioMPs (T1)	51050.00 (43400.00 – 61650.00)	38600.00 (4600.40 – 46100.00)	0.034*
CardioMPs (T2)	44150.00 (40075.00 – 60125.00)	36400.00 (6192.60 – 50500.00)	0.172
EMPs (T0)	495.00 (307.50 – 637.50)	680.00 (380.00 – 2080.65)	0.012*
EMPs (T1)	415.00 (230.00 – 770.00)	730.00 (465.00 – 2779.05)	0.016*
EMPs (T2)	355.00 (272.50 – 756.90)	620.00 (445.00 – 2673.10)	0.097
TFMPs (T0)	20400.00 (1070.00 – 47800.00)	1510.70 (473.50 – 9112.50)	0.011*
TFMPs (T1)	18900.00 (795.00 – 48325.00)	956.85 (489.18 – 7631.83)	0.188
TFMPs (T2)	10750.00 (1037.50 – 454675.00)	2157.45 (605.00 – 10275.00)	0.128
PMPs (T0)	1815.00 (1032.50 – 3230.00)	1485.00 (409.60 – 3365.15)	0.633
PMPs (T1)	1175.00 (275.48 – 2885.00)	1430.00 (115.00 – 2565.00)	0.282
PMPs (T2)	1855.00 (720.00 – 2372.50)	1355.30 (113.30 – 3347.50)	0.419

Table 1. Microparticles (MPs) according to DOXO-cardiotoxicity in breast cancer patients (N=80).

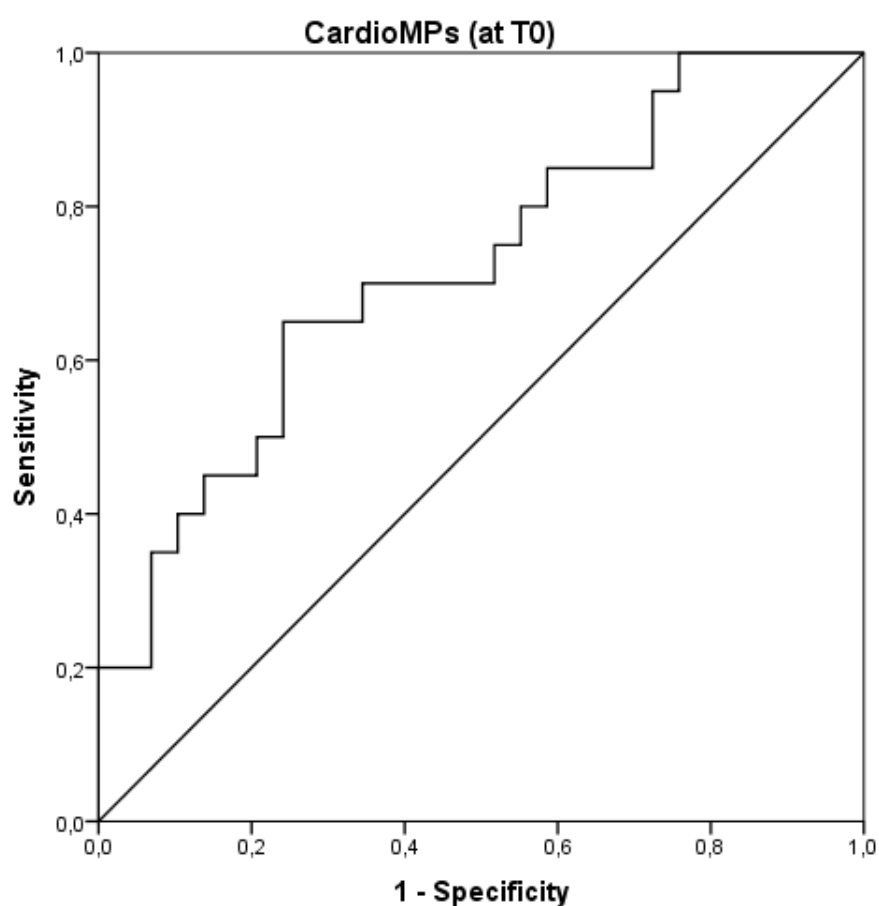
MPs/ μ L	Cardiotoxicity group (n= 27; 33,8%)	No-cardiotoxicity group (n= 53; 66,3%)	p-value
Total-MPs (T0)	53200.00 (39650.00 – 65100.00)	36900.00 (6651.50 – 47325.00)	0.034*
Total-MPs (T1)	46800.00 (40500.00 – 61650.00)	40700.00 (7069.85 – 46525.00)	0.263
Total-MPs (T2)	44700.00 (40650.00 – 61550.00)	35250.00 (6789.60 – 50000.00)	0.101
CardioMPs (T0)	51600.00 (38450.00 – 65100.00)	35300.00 (5339.20 – 47600.00)	0.009*
CardioMPs (T1)	51050.00 (43400.00 – 61650.00)	38600.00 (4600.40 – 46100.00)	0.034*
CardioMPs (T2)	44150.00 (40075.00 – 60125.00)	36400.00 (6192.60 – 50500.00)	0.172
EMPs (T0)	495.00 (307.50 – 637.50)	680.00 (380.00 – 2080.65)	0.012*
EMPs (T1)	415.00 (230.00 – 770.00)	730.00 (465.00 – 2779.05)	0.016*
EMPs (T2)	355.00 (272.50 – 756.90)	620.00 (445.00 – 2673.10)	0.097
TFMPs (T0)	20400.00 (1070.00 – 47800.00)	1510.70 (473.50 – 9112.50)	0.011*
TFMPs (T1)	18900.00 (795.00 – 48325.00)	956.85 (489.18 – 7631.83)	0.188
TFMPs (T2)	10750.00 (1037.50 – 454675.00)	2157.45 (605.00 – 10275.00)	0.128
PMPs (T0)	1815.00 (1032.50 – 3230.00)	1485.00 (409.60 – 3365.15)	0.633
PMPs (T1)	1175.00 (275.48 – 2885.00)	1430.00 (115.00 – 2565.00)	0.282
PMPs (T2)	1855.00 (720.00 – 2372.50)	1355.30 (113.30 – 3347.50)	0.419

MPs: microparticles; **Total-MPs:** MPs marked with AnnexinV-eFluor450; **CardioMPs:** MPs derived from cardiomyocytes (marked with anti-caveolin3-AlexaFluor647); **EMPs:** MPs derived from endothelial cells (marked with anti-CD51/61-FITC); **TFMPs:** MPs that express tissue factor in surface (marked with anti-CD142-PE); **PMPs:** MPs derived from platelets (marked with anti-CD41a-PE-Cy7); **T0:** baseline follow-up point (prior to DOXO-chemotherapy); **T1:** first follow up point (out up to 7 days after the last DOXO-chemotherapy cycle); **T2:** last follow-up point (at 12 months after the last DOXO-chemotherapy cycle).

Data not normally distributed were expressed as median (25th-75th) and compared by Mann–Whitney U test.

*Significant $p < 0.05$

Figure 1. The Receiver Operating Characteristic (ROC) for CardioMPs (at T0).



Area under the curve was 0.721 (95% CI 0.575 – 0.866; $p=0.009$). CardioMPs: MPs derived from cardiomyocytes.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo destaca-se pela sua originalidade e ineditismo no que contempla o perfil hemostático em pacientes com câncer de mama utilizando-se uma técnica de avaliação global da hemostasia e na nova abordagem de classificação da cardiotoxicidade secundária à quimioterapia.

Dessa forma, pode-se destacar as principais conclusões:

- O TGT demonstra-se útil na avaliação e monitoramento prospectivo do perfil hemostático em pacientes com câncer de mama em tratamento quimioterápico com DOXO.
- Pacientes com câncer de mama possuem risco alto para TEV antes da quimioterapia com DOXO, por meio da aplicação do COMPASS-CAT score.
- Pacientes com câncer de mama apresentaram níveis elevados de GDF-15 após a quimioterapia, comparadas com mulheres híginas.
- A avaliação de MPs demonstra-se útil na investigação fisiopatológica da cardiotoxicidade secundária à quimioterapia com DOXO, especialmente aquelas derivadas de cardiomiócitos.
- A avaliação de MPs possui potencial na avaliação das mudanças no perfil hemostático de pacientes com câncer de mama em uso de DOXO.

As observações quanto aos novos biomarcadores (como o GDF-15) ainda são bastante preliminares. Sugerimos a realização de um estudo com um desenho longitudinal prospectivo, com tamanho amostral superior ao utilizado e em múltiplos centros.

O risco aumentado para TEV das pacientes com câncer de mama em uso de DOXO foi outro dado destacável desse estudo. Ao aplicarmos um score de risco já validado para essa população, evidenciou-se que as pacientes com câncer de mama em quimioterapia com DOXO possuem alto risco para TEV, apesar da baixa frequência de desfechos tromboembólicos.

Obviamente que os mecanismos propostos devem ser avaliados criteriosamente, visto que não foram avaliados marcadores das vias de anticoagulação natural nem de fibrinólise (como o dímero-D). Estudos futuros que avaliem dímero-D, anti-trombina, atividades das proteínas C e S, fatores de coagulação, poderão ter notoriedade nesse quesito.

Contudo, acreditamos que a aplicação do TGT é de utilidade clínica significativa, visto que dele derivam diversos parâmetros que podem ser interpretados em conjunto com dados clínicos, auxiliando no monitoramento e manejo do risco de TEV ou mesmo, de complicações tromboembólicas.

A liberação de MPs observada nesse estudo é um ponto em comum entre as duas abordagens aqui investigadas (cardiotoxicidade e hemostasia). Acreditamos que os eventos de toxicidade celular cardíaca culminem na liberação dessas vesículas, contribuindo ainda para a alteração do perfil hemostático dessas pacientes. Isso fica bem evidente ao analisarmos as vesículas derivadas de cardiomiócitos, de endotélio e que expressam FT.

De fato, um dos resultados desse estudo que merece destaque é justamente a avaliação dessas MPs, principalmente as derivadas de cardiomiócitos. Como discutido no escopo desse trabalho, não conhecemos na literatura científica estudos com essa abordagem. Na verdade, estudos clínicos com MPs derivadas de cardiomiócitos são, até o presente momento, inexistentes.

Sumarizando, acreditamos que as observações desse estudo são oportunas para elucidação fisiopatológica do desfecho da cardiotoxicidade e das alterações hemostáticas e ainda possuem potencial para aplicação clínica, dessa forma, contribuindo para o melhor manejo das pacientes com câncer de mama em uso de DOXO.

APÊNDICE I

1. Validação de anticorpo para determinação de micropartículas derivadas de cardiomiócitos

A fim de validar a hipótese de que a caveolina-3 pode ser utilizada como marcador de CMPs, realizou-se um experimento prévio à marcação das amostras das participantes do estudo. Devido à indisponibilidade comercial de anticorpo anti-caveolina-3 conjugado com fluorocromo para citometria de fluxo, selecionamos um anticorpo secundário para a marcação, o fluorocromo AlexaFluor 647.

Para testar este reagente, selecionamos como amostra positiva uma alíquota de soro obtida de um indivíduo (do sexo feminino) com o diagnóstico clínico de infarto agudo do miocárdio, onde dosou-se os marcadores bioquímicos utilizados na clínica para diagnóstico e acompanhamento do infarto, como a cTnI e atividade da creatinofosfoquinase fração MB (CK-MB). A atividade da creatinofosfoquinase (CPK-total) também foi dosada, visto que o tecido muscular esquelético expressa caveolinas, sobretudo a caveolina-1. O NT-próBNP também foi dosado nessa amostra. Partindo da amostra “pura”, diluiu-se a mesma (fator 1:100) utilizando-se solução salina 0,9%. As concentrações dos marcadores bioquímicos das amostras podem ser vistas no **Quadro 8**.

Os ensaios de CK-MB, CPK-total, cTnI e NT-próBNP foram realizados no analisador Vitros 5600 da OrthoClinical Diagnostics®. As enzimas CK-MB e CPK-total foram realizadas por meio do método cinético de múltiplos pontos, enquanto os marcadores cTnI e NT-próBNP foram realizados pelo imunoensaio por quimioluminescência

Para os marcadores determinados na alíquota em questão, adotamos os seguintes valores de referência sugeridos pelo fabricante para o sexo feminino e idade < 75 anos: CK-MB < 16 U/L, CPK total de 30 – 135 U/L, cTnI < 0,012 ng/mL e de NT-próBNP < 125 pg/mL.

Quadro 8 - Concentrações de marcadores bioquímicos de amostras controles utilizados na padronização para experimento de micropartículas derivadas de cardiomiócitos.

Amostra	cTnI (ng/mL)	CPK-total (U/L)	CK-MB atividade (U/L)	NT-proBNP (pg/mL)
Controle Positivo puro	6,86	182	30	202
Controle Positivo 1:100	< 0,012	< 20	< 3	< 11,1

cTnI: troponina I; CPK: creatinofosfoquinase; CK-MB: creatinofosfoquinase fração MB; NT-próBNP: porção N-terminal do peptídeo natriurético tipo B

Procedeu-se então a obtenção do PPP, seguindo os mesmos procedimentos empregados nas amostras das participantes do projeto, para a execução da técnica de micropartículas. O procedimento experimental para análise de micropartículas foi detalhado na seção 3.9.6.

2. Titulação de anticorpos

Com o objetivo de otimizar o ensaio das MPs por citometria de fluxo, procedeu-se a titulação dos anticorpos-fluocromos selecionados no painel de acordo com o **Quadro 9**. A titulação visa definir a quantidade de saturação de anticorpo-fluorocromos necessária para a análise, sem que haja subestimação ou superestimação dos sinais de fluorescência emitidos.

Para os ensaios de titulação e padronização dos anticorpos-fluorocromos utilizamos a mesma amostra chamada de “controle positivo puro” constante no item anterior, julgando que é uma amostra rica em MPs e ideal para utilizarmos como referência.

Quadro 9 - Títulos de anticorpos/fluorocromos testados na padronização de ensaio de MPs.

Anticorpo	Título
anexina V-eFluor 450	1,0 µL
	2,5 µL
anti-caveolina-3	1,0 µL

	2,0 µL
	5,0 µL
anti-CD51/61-FITC	1,0 µL
	2,0 µL
	3,0 µL
anti-CD142-PE	1,0 µL
	2,0 µL
	3,0 µL
anti-CD41a-PE-Cy7	1,0 µL
	2,0 µL
	3,0 µL

Os resultados das titulações dos anticorpos e fluorocomas encontram-se demonstrados nas **Figuras 6 e 7**.

Ainda na **Figura 6**, temos a determinação do *gate* de MPs de acordo com o gráfico de tamanho vs granulosidade quando se utilizou o título de anti-anexina V de 2,5 μ L. Esse resultado demonstrou-se como o mais otimizado para o painel, pois houve uma separação nítida entre os eventos positivos para marcação que se liga à fosfatidilserina. A partir desse, realizou-se a análise dos próximos anticorpo-fluorocromos.

Figura 6 - Titulação de anti-anexina V-eFluor 450.

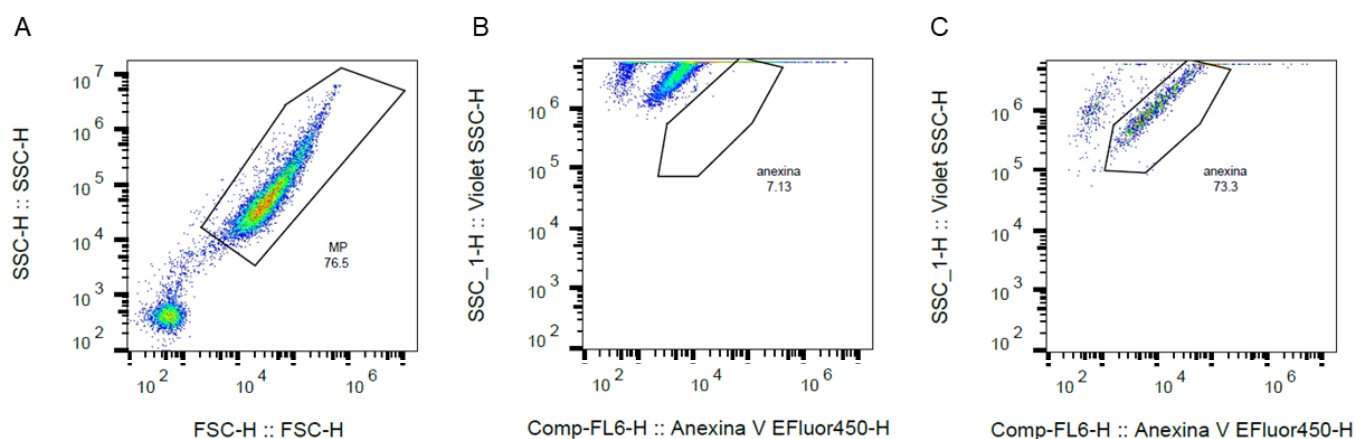
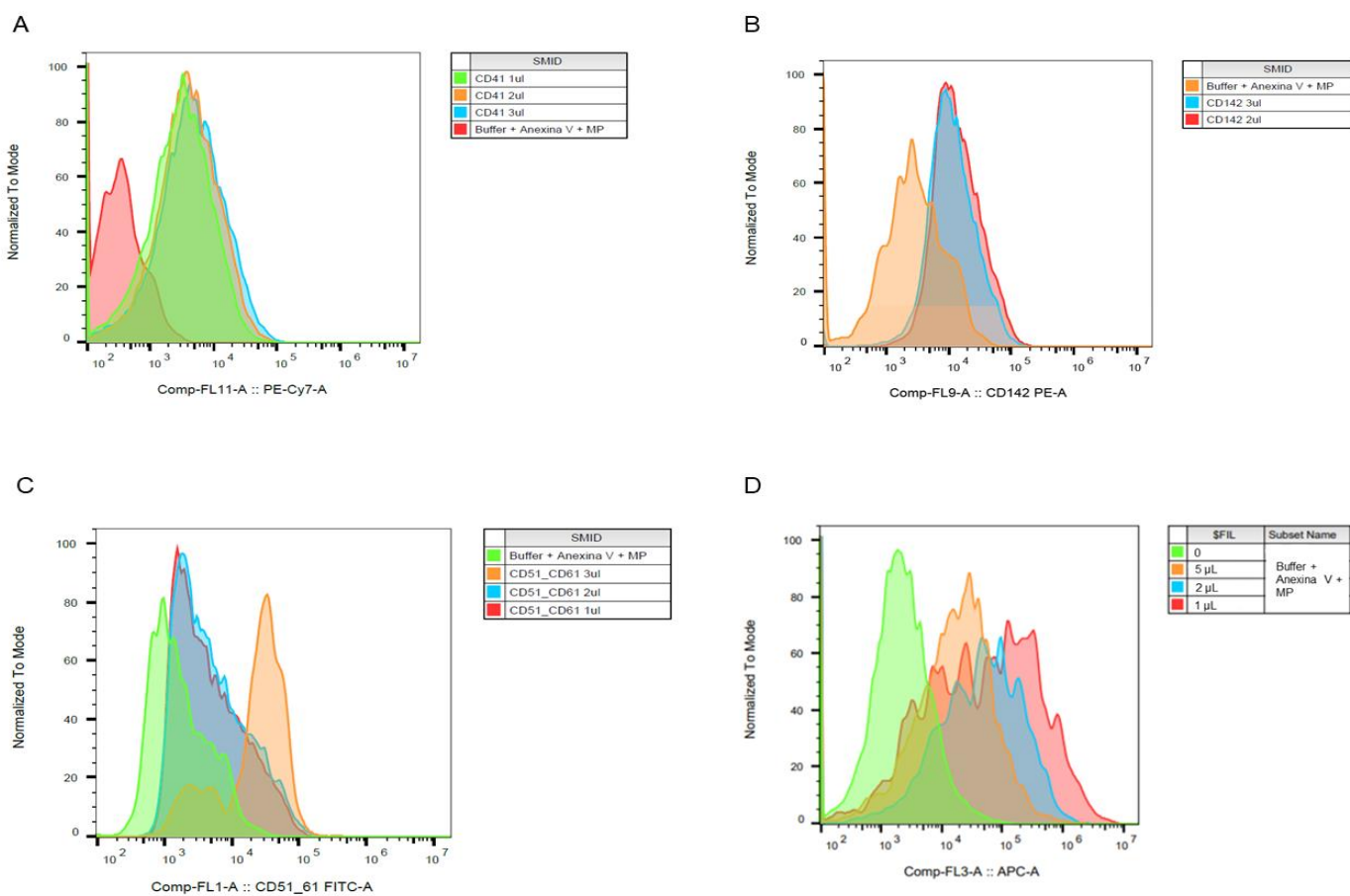


Figura 7 - Titulação dos anticorpos para análise de PMPs, FTMPs, EMPs e CMPs.



Com base nestes dados, ficaram padronizados os seguintes títulos:

- anexina V-eFluor 450: 2,5 µL
- anti-CD41a-PE-Cy: 1,0 µL
- anti-CD142-PE: 2,0 µL
- anti-CD51/61-FITC: 3,0 µL
- anti-caveolina3: 2,0 µL
- anticorpo secundário AlexaFluor647: 2,0 µL

ANEXO I**Aprovação do COEP/UFMG**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 38538714.2.0000.5149

Interessado(a): Prof^a. Karina Braga Gomes Borges
Departamento de Análises Clínicas e
Toxicológicas
Faculdade de Farmácia- UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 04 de dezembro de 2014, o projeto de pesquisa intitulado **"Determinação de miRNA's relacionados ao sistema renina-angiotensina, associados à cardiomiopatia secundária ao uso de quimioterápico Doxorrubicina em pacientes portadoras de câncer de mama"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto através da Plataforma Brasil.

Prof^a. Dr^a. Telma Campos Medeiros Lorentz
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO II

Aprovação do CEP/FHEMIG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação dos marcadores bioquímicos e determinação de miRNAs relacionados ao sistema renina-angiotensina associados à eventos cardiovasculares secundários ao uso de quimioterápico doxorrubicina em pacientes portadoras de câncer de mama

Pesquisador: Ricardo Simões

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 54376216.0.0000.5119

Instituição Proponente: Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais - FHEMIG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.459.638

Apresentação do Projeto:

Estudo devidamente encaminhado e já aprovado pela Instituição Proponente: UFMG com Parecer N° 898.544 de 02/12/2014 e pela CEP-FHEMIG – Parecer 005/2015 de 19/03/2015.

Devido o fato do mesmo ter tramitado na FHEMIG fora da Plataforma Brasil e devido a impossibilidade de encaminhar o registro original novamente para o CEP-FHEMIG (mesmo após solicitação via Chat de Ajuda da CONEP), foi feita uma nova submissão para o pleno cumprimento da Resolução 466/2012 - CONEP/MS.

Objetivo da Pesquisa:

Avaiar os marcadores bioquímicos BNP, galactina 3 e troponina e a expressão de miRNAs relacionados ao SRAA como indicadores da disfunção sistólica do ventrículo esquerdo em portadores de CA de mama e submetidos ao protocolo QT com antracíclicos isoladamente ou em associação com trastuzumabe.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

- RISCOS: o estudo apresenta baixos riscos, pois se baseia em intervenção já padronizada e validada na literatura nacional e internacional.

Endereço: Alameda Vereador Álvaro Celso, 100
Bairro: Bairro Santa Efigênia **CEP:** 30.150-260
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3239-9552 **Fax:** (31)3239-9552 **E-mail:** cep@fhemig.mg.gov.br



FUNDAÇÃO HOSPITALAR DO
ESTADO DE MINAS GERAIS -
FHEMIG



Continuação do Parecer: 1.458.638

- **BENEFÍCIOS:** possíveis benefícios diretos para os envolvidos, para a comunidade científica em geral e a FHEMIG.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

- Projeto: Relevante, pertinente e de valor científico;
- Metodologia: Adequada para se alcançar o objetivo proposto;
- Currículos: Com competência reconhecida para a condução do estudo;
- Aspectos Éticos: O projeto cumpre a Res.466/2012 do CNS-MG.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- Projeto: devidamente descrito;
- TCLE: adequado para o perfil da amostra, necessitando apenas a inclusão do contato do CEP-FHEMIG;
- Parecer GEP: Aprovado;
- FR: devidamente preenchida e assinada.
- Parecer Consubstanciado da Instituição Proponente: Aprovado

Recomendações:

- Enviar semestralmente ao CEP-FHEMIG os relatórios parciais e/ou final da pesquisa via Plataforma Brasil.
- Incluir no TCLE o contato do CEP-FHEMIG: Alameda Álvaro Celso, 100, Sta. Efigênia, BH-MG. Telefone: (31)3239-9552. e-mail: cep@fhemig.mg.gov.br

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O estudo pode ser realizado sem restrições.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_676617.pdf	20/03/2016 21:55:20		Aceito
Outros	QUESTIONARIOINDIVIDUAL.doc	10/03/2016 12:23:19	Ricardo Simões	Aceito
Orçamento	Orçamento.docx	10/03/2016 12:19:39	Ricardo Simões	Aceito
Projeto Detalhado	BrochuraPesquisador_Fhemig2015.	10/03/2016	Ricardo Simões	Aceito

Endereço: Alameda Vereador Álvaro Celso, 100
Bairro: Bairro Santa Efigênia CEP: 30.150-260
UF: MG Município: BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3239-9552 Fax: (31)3239-9552 E-mail: cep@fhemig.mg.gov.br



FUNDAÇÃO HOSPITALAR DO
ESTADO DE MINAS GERAIS -
FHEMIG



Continuação do Parecer: 1.459.638

/ Brochura Investigador	docx	12:17:48	Ricardo Simões	Aceito
Brochura Pesquisa	ProjetoPesquisador_Fhemig2015.docx	10/03/2016 12:17:22	Ricardo Simões	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEFhemig.pdf	10/03/2016 12:09:23	Ricardo Simões	Aceito
Cronograma	Cronogramadeexecucao.docx	09/03/2016 01:26:56	Ricardo Simões	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CartadeAceite.pdf	09/03/2016 01:20:40	Ricardo Simões	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CartadeAnuenciaHAC.pdf	09/03/2016 01:20:20	Ricardo Simões	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto1Cardiotox.pdf	09/03/2016 01:12:10	Ricardo Simões	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 21 de Março de 2016

Assinado por:
Vanderson Assis Romualdo
(Coordenador)

ANEXO III

Artigo publicado em co-autoria na *Cardiovascular Toxicology*

Cardiovascular Toxicology
<https://doi.org/10.1007/s12012-020-09600-7>



Identification of Clinical and Laboratory Variables Associated with Cardiotoxicity Events Due to Doxorubicin in Breast Cancer Patients: A 1-Year Follow-Up Study

Ricardo Simões^{1,2,3,4} · Luciana Maria Silva⁵ · Angélica Navarro de Oliveira⁴ · Michelle Teodoro Alves¹ · Rodrigo Mendonça Cardoso Pestana¹ · Isabella Dâmaris Passos de Souza¹ · Heloísa Helena Marques Oliveira⁵ · Cintia Esteves Soares³ · Adriano de Paula Sabino¹ · Karina Braga Gomes¹

Received: 9 April 2020 / Accepted: 14 August 2020
 © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

Cardiovascular adverse events in patients with breast cancer undergoing chemotherapy (CT) are frequent due to the high cardiotoxic potential of treatments, especially doxorubicin (DOXO). This study aimed to evaluate the association of plasma levels of various biomarkers with cardiotoxicity in women with breast cancer on DOXO-based chemotherapy. In this single center prospective cohort, 80 breast cancer patients who used DOXO as a first-line treatment for cancer were evaluated. Patients were assessed at three time points: before CT (T0), 1 week after (T1) and 12 months after DOXO treatment (T2). The predominant histological classification was ductal carcinoma, $n=72$ (90.0%); the most frequent molecular classification was Human epidermal growth factor receptor-type 2 positive (HER2+), $n=34$ (43.0%). In patients submitted to complementary treatment with trastuzumab ($n=23$), there was no association with cardio-specific biomarkers. Evaluating the clinical variables and the laboratory parameters in T1 and T2 in relation to T0, the reduction any time of N-terminal-pro hormone B-type natriuretic peptide (NT-proBNP), triglycerides and hematocrit levels showed an association with higher cardiotoxicity risk. In addition, increased levels of troponin I (cTnI) and glycated hemoglobin (HbA_{1c}) showed an independent association with the occurrence of cardiotoxicity. These results suggest that the evaluation of these laboratory tests should be included routinely to identify breast cancer patients under DOXO treatment at cardiotoxicity risk.

Keywords Breast cancer · Cardiotoxicity · Laboratory tests · Chemotherapy · Doxorubicin · Cardiac markers

ANEXO IV

Artigo publicado em co-autoria na *Immunological Investigations*

IMMUNOLOGICAL INVESTIGATIONS
<https://doi.org/10.1080/08820139.2021.1882486>



Interleukin-10 Levels are Associated with Doxorubicin-Related Cardiotoxicity in Breast Cancer Patients in a One-Year Follow-Up Study

Michelle Teodoro Alves^a, Ricardo Simões^{a,b}, Rodrigo Mendonça Cardoso Pestana^a, Angélica Navarro de Oliveira^c, Heloísa Helena Marques Oliveira^d, Cintia Esteves Soares^e, Adriano de Paula Sabino^a, Luciana Maria Silva^d, and Karina Braga Gomes^a

^aDepartamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; ^bFaculdade Ciências Médicas de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; ^cInstituto de Hipertensão, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; ^dFundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; ^eFundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

ABSTRACT

Background: Myocardial toxicity is a common side effect of doxorubicin (DOXO) therapy in breast cancer patients. We hypothesized that DOXO-induced cardiotoxicity may be related to the release of inflammatory cytokines in response to the treatment. This study aimed to assess changes in plasma levels of interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-10 and tumor necrosis factor (TNF) after chemotherapy and to correlate these levels with cardiac biomarkers and clinical data.

Methods: Sixty-four patients with breast cancer treated with DOXO were included. Twenty-two subjects (cases) developed cardiotoxicity until one year after the end of DOXO treatment. Cytokines and cardiac markers were evaluated before starting chemotherapy (T0), up to 7 days after the last infusion (T1) and 12 months after the last infusion (T2).

Results: Higher IL-10 levels were observed in the case group compared to controls at T1 ($p = .006$) and T2 ($p = .046$). The IL-1 β , IL-6 and TNF levels did not change during treatment in each group ($p > .05$), nor between the case and control groups. The IL-10 levels were higher at T1 than at T0 and T2 ($p < .05$ for both) in the cardiotoxicity group. A correlation between IL-10 and N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) levels at T0 and T2 in the cardiotoxicity group was observed ($p = .048$ and $p = .004$, respectively).

Conclusion: Our study demonstrated that DOXO induced an increase in plasma IL-10 levels in patients who presented cardiotoxicity after treatment, which correlated with NT-proBNP levels.

KEYWORDS

Breast cancer; chemotherapy; doxorubicin; cardiotoxicity; cytokine

ANEXO V

Resumo publicado em Anais de Evento Internacional: ISTH 2020

11/10/2022 00:07

Evaluation of Thrombomodulin Levels in Women with Breast Cancer Undergoing Doxorubicin Treatment - ISTH Congress Ab..

Evaluation of Thrombomodulin Levels in Women with Breast Cancer Undergoing Doxorubicin Treatment

M. Teodoro Alves Vieira¹, R. Simões², L.M. Silva³, H.H. Oliveira³, I.D. Souza¹, M.D.G. Carvalho¹, L.M. Dusse¹, A.D.P. Sabino¹, R.M. Pestana¹, K.B. Borges¹

¹Federal University of Minas Gerais, Faculty of Pharmacy, Belo Horizonte, Brazil, ²Alberto Cavalcanti Hospital, Belo Horizonte, Brazil, ³Ezequiel Dias Foundation, Belo Horizonte, Brazil

Abstract Number: PB0476

Meeting: ISTH 2020 Congress

Theme: Diagnostics and OMICs » Biomarkers of Thrombosis and Hemostasis

Background: Thrombomodulin is a membrane glycoprotein present on the surface of endothelial cells, which is often increased in response to diffuse endothelial damage.

Aims: To investigate thrombomodulin levels in women with breast cancer treated with doxorubicin (DOXO) and the association of this glycoprotein with molecular subtypes of breast cancer.

Methods: Our study included 80 breast cancer patients under treatment with DOXO attended at the Hospital Alberto Cavalcanti (FHEMIG). The study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais and FHEMIG, according to Declaration of Helsinki. All participating previously signed the informed consent form. Thrombomodulin levels in serum samples taken before (T0) and after the last cycle (T1) of chemotherapy were measured by Multiplex immunoassay. Patients were grouped according to molecular classification: luminal, HER2 positive (HER2+) and triple negative. A statistical analysis was performed in SPSS v.17.0 software.

Results: In all patients, the median thrombomodulin was 3.81 ng/mL (IQR 1.98) at T0 and 4.80 ng/mL (IQR 2.86) at T1 ($p > 0.05$). The most frequent molecular classification was HER2+, $n=33$ (41.8%). At T0, median levels of thrombomodulin was 4.08 ng/mL (IQR 3.59) for luminal, 3.68 ng/mL (IQR 1.72) for HER2+ and 3.65 ng/mL (IQR 2.13) for triple negative. At T1, median levels of thrombomodulin was 4.93 ng/mL (IQR 3.31) for luminal, 4.45 ng/mL (IQR 2.52) for HER2+ and 4.97 ng/mL (IQR 1.92) for triple negative. There was no difference between the two times and the subtypes of breast cancer for thrombomodulin levels ($p > 0.05$).

Conclusions: The assessment of thrombomodulin cannot contribute to the evaluation of endothelial injury post-DOXO treatment in women with breast cancer and is not associated with the molecular subtype of tumor.

Acknowledgments: CNPq and FAPEMIG.

To cite this abstract in AMA style:

Teodoro Alves Vieira M, Simões R, Silva LM, Oliveira HH, Souza ID, Carvalho MDG, Dusse LM, Sabino ADP, Pestana RM, Borges KB. Evaluation of Thrombomodulin Levels in Women with Breast Cancer Undergoing Doxorubicin Treatment [abstract]. *Res Pract Thromb Haemost.* 2020; 4 (Suppl 1). <https://abstracts.isth.org/abstract/evaluation-of-thrombomodulin-levels-in-women-with-breast-cancer-undergoing-doxorubicin-treatment/>. Accessed October 10, 2022.

ANEXO VI

Resumo publicado em Anais de Evento Internacional: ISTH 2021

11/10/2022 00:06

Breast Cancer, Doxorubicin and Cardiotoxicity: Can Thrombin Generation Test Be Useful? - ISTH Congress Abstracts

Breast Cancer, Doxorubicin and Cardiotoxicity: Can Thrombin Generation Test Be Useful?

R.M.C. Pestana¹, R.C.F. Duarte¹, A.d.P. Sabino¹, L.M. Silva², R. Simões¹, K.B. Gomes¹, M.d.G. Carvalho¹

¹Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ²Ezequiel Dias Foundation, Belo Horizonte, Brazil

Abstract Number: PB1128

Meeting: ISTH 2021 Congress

Theme: Venous Thromboembolism » Cancer Associated Thrombosis

Background: Anthracyclines, especially doxorubicin (DOXO), are widely used in the treatment of patients with breast cancer. However, secondary cardiotoxicity is a limiting outcome to its use. Cancer patients commonly present hemostatic abnormalities correlating with the worsening of the disease. Thrombin Generation Test (TGT) may be a useful tool for detecting such abnormalities in patients with breast cancer using DOXO, particularly those who develop cardiotoxicity.

Aims: To evaluate the performance of TGT in patients with breast cancer before and after treatment with DOXO, with or without treatment-related cardiotoxicity.

Methods: Blood samples were collected from 80 women with breast cancer at different times, before (T0), shortly after (T1) and one year after the use of DOXO (T2) (median dose was 380 mg/m²). Invasive carcinoma was observed in 72 participants (90.0%) followed by other less frequent types. TGT was performed using the CAT method. The study received approval from the local Ethics Committee and is in accordance with the Declaration of Helsinki.

Results: Of the total participants, 27 (33.75%) had cardiotoxicity, while 53 (66.25%) did not. Only at T0, an increased value for the Peak was observed in those who developed cardiotoxicity ($p=0.030$), suggesting that hypercoagulability, a priori, may predispose to this complication. However, the use of DOXO increased Peak and Endogenous Thrombin Potential (ETP) values in relation to their baseline levels (T0 x T1 and T0 x T2; $p < 0.001$ for both), only in those who did not develop cardiotoxicity, that is, in those who were less hypercoagulable in T0.

Conclusions: This finding suggests that the use of DOXO increases the hypercoagulable status. Moreover, evaluation by TGT before treatment with DOXO may be a useful predictor of cardiotoxicity in women with breast cancer who will be treated with this drug.

To cite this abstract in AMA style:

Pestana RMC, Duarte RCF, Sabino AdP, Silva LM, Simões R, Gomes KB, Carvalho MdG. Breast Cancer, Doxorubicin and Cardiotoxicity: Can Thrombin Generation Test Be Useful? [abstract]. *Res Pract Thromb Haemost.* 2021; 5 (Suppl 2). <https://abstracts.isth.org/abstract/breast-cancer-doxorubicin-and-cardiotoxicity-can-thrombin-generation-test-be-useful/>. Accessed October 10, 2022.

ISTH Congress Abstracts - <https://abstracts.isth.org/abstract/breast-cancer-doxorubicin-and-cardiotoxicity-can-thrombin-generation-test-be-useful/>

ANEXO VII

Apresentação oral de trabalho em Congresso Internacional: 24th World Congress on Advances in Oncology and 24th International Symposium on Molecular Medicine

	Spandidos Publications Ltd.	
<i>International Journal of Oncology ♦ Oncology Reports</i> <i>International Journal of Molecular Medicine ♦ Oncology Letters</i> <i>Molecular Medicine Reports ♦ Experimental and Therapeutic Medicine</i> <i>Molecular and Clinical Oncology ♦ Biomedical Reports ♦ World Academy of Sciences Journal</i>		
<i>CERTIFICATE OF PRESENTATION</i>		
This is to certify that		
<i>Dr Rodrigo Mendonça Cardoso Pestana</i>		
presented the following Oral presentation on 10th October, 2019		
<i>“Thrombomodulin: Correlation with inflammatory and cardiac parameters in women with breast cancer and chemotherapy with doxorubicin”</i>		
Co-authored by:		
<i>Ricardo Simões, Luciana Maria Silva, Heloisa Helena Marques Oliveira, Adriano de Paula Sabino, Michele Teodoro Alves, Karina Braga Gomes</i>		
at the 24th World Congress on Advances in Oncology and 24th International Symposium on Molecular Medicine		
Sparta, Greece October 10-12, 2019		
Demetrios A. Spandidos		
		
Spandidos Publications Ltd. Editor: Professor D.A. Spandidos, BSc, PhD, FRCPATH, DSc, FRSH, FASA P.O.B. 18179, Athens 11610, Greece • Editorial Office: 10 Vriaxidos Street, Athens 11635, Greece e-mail: contact@spandidos-publications.com • website: www.spandidos-publications.com Tel: 30 210 722 7809 • Fax: 30 210 725 2922		

ANEXO VIII

Apresentação oral de trabalho em Congresso Nacional: 47º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas



Certificamos que o trabalho intitulado

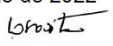
GDF-15 (Fator De Crescimento E Diferenciação Celular-15) Como Marcador Laboratorial Para Acompanhamento De Mulheres Com Câncer De Mama Após Quimioterapia

do(s) autor(es) **Rodrigo Mendonça Cardoso Pestana, Júnea Paolucci de Paiva Silvino, Angélica Navarro de Oliveira, Adriano de Paula Sabino, Ricardo Simões e Karina Braga Gomes** foi apresentado **oralmente**, por Rodrigo Mendonça Cardoso Pestana, no **VIII Encontro Científico da RBAC**, realizado no 47º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas.

Fortaleza, 22 de junho de 2022


Sociedade Brasileira de Análises Clínicas


Dra. Maria Elizabeth Menezes
Presidente da SBAC


Dra. Lenira da Silva Costa
Secretária da SBAC


Dr. Egberto Feltosa Filho
Presidente do 47º CBAC

ANEXO IX

Apresentação oral de trabalho em Congresso Nacional: 47º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas

Certificamos que o trabalho intitulado

Níveis Plasmáticos De IL-10 como Marcador Laboratorial Relacionado Ao Risco De Tromboembolismo Venoso No Câncer De Mama

do(s) autor(es) **Rodrigo Mendonça Cardoso Pestana, Michelle Teodoro Alves, Angélica Navarro de Oliveira, Adriano de Paula Sabino, Ricardo Simões e Karina Braga Gomes** foi apresentado **oralmente**, por Rodrigo Mendonça Cardoso Pestana, no **VIII Encontro Científico da RBAC**, realizado no 47º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas.

Fortaleza, 22 de junho de 2022




Dra. Maria Elizabeth Menezes
Presidente da SBAC


Dra. Lenira da Silva Costa
Secretária da SBAC


Dr. Egberto Feitosa Filho
Presidente do 47º CBAC

ANEXO X**Orientações de trabalhos de conclusão de curso (TCC) de graduação****C E R T I F I C A D O****CERTIFICAMOS, PARA OS DEVIDOS FINS QUE**

Ieda de Fátima Oliveira Silva – orientadora, **Rodrigo Mendonça Cardoso Pestana** – coorientador, **Maria Gabrielle de Lima Rocha** e **Valéria Fernandes de Souza**, participaram como membros da Comissão Examinadora da Monografia de Conclusão de Curso, intitulada “*IMPACTOS INDIVIDUAIS E COLETIVOS NA SAÚDE PROVOCADOS POR FOBIA DE AGULHAS*” apresentada pela aluna Aline Persichini Cunha Gonçalves Vieira.

Belo Horizonte, 26 de fevereiro de 2021.



Profa Dra. Cristina Duarte Vianna Soares
Coordenadora do Colegiado de Coordenação Didática do Curso de Farmácia

FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha – CEP 31270-901 – Fone: 31 3409-6742/6743/6744
cografar@farmacia.ufmg.br www.farmacia.ufmg.br

04/04/2022 13:10

SEI/UFMG - 1265570 - Certificado



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
COLEGIADO DE GRADUAÇÃO DO CURSO DE BIOMEDICINA

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS, PARA OS DEVIDOS FINS, QUE **-Doutorando Rodrigo Mendonça Cardoso Pestana - orientador, Profa. Dra. Karina Braga Gomes Borges – coorientadora e a Dra. Maria Augusta Amaral Campos** participaram como membros da Comissão Examinadora da Monografia de Conclusão de Curso, intitulada **"Panorama das creditações laboratoriais no Brasil"** , apresentada pelo(a) aluno(a) **Carolina Ponzo Pires**.

Belo Horizonte, 28 de Janeiro de 2022.

Professora Dra Ana Paula Lucas Mota
Silva Menezes

Professora Dra Cristiane Alves

Coordenadora do Colegiado do Curso de Biomedicina
Clínicas e Toxicológicas

Departamento de Análises



Documento assinado eletronicamente por **Cristiane Alves da Silva Menezes, Subcoordenador(a)**, em 24/03/2022, às 16:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Paula Lucas Mota, Coordenador(a) de curso**, em 04/04/2022, às 13:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1265570** e o código CRC **D6F036A3**.

Referência: Processo nº 23072.204184/2022-51

SEI nº 1265570

09/09/2022 14:01

SEI/UFMG - 1590400 - Certificado



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
COLEGIADO DO CURSO DE BIOMEDICINA

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS, PARA OS DEVIDOS FINS, QUE **Rodrigo Mendonça Cardoso Pestana (orientador)**, **Karina Braga Gomes Borges (coorientadora)** e **Lilian Patrícia Matos Cruz (examinadora)** participaram como membros da Comissão Examinadora da Monografia de Conclusão de Curso, intitulada **"Análise Da Efetividade De Comunicação De Resultados Críticos Em Um Laboratório Clínico De Regime Ambulatorial no Laboratório Clínico"**, apresentada pelo(a) aluno(a) **Maria Clara da Silva Barata**.

Belo Horizonte, 05 de Julho de 2022.

Professora Ana Paula Lucas Mota

Professora Cristiane Alves Silva Menezes

Coordenadora do Colegiado do Curso de Biomedicina
Toxicológicas

Departamento de Análises Clínicas e



Documento assinado eletronicamente por **Cristiane Alves da Silva Menezes, Subcoordenador(a)**, em 14/07/2022, às 13:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Paula Lucas Mota, Coordenador(a) de curso**, em 10/08/2022, às 09:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1590400** e o código CRC **EEA09AFC**.

Referência: Processo nº 23072.240380/2022-99

SEI nº 1590400

09/09/2022 13:12

SEI/UFG - 1735724 - Declaração



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
COLEGIADO DO CURSO DE BIOMEDICINA

DECLARAÇÃO

CERTIFICAMOS, PARA OS DEVIDOS FINS, QUE **Rodrigo Mendonça Cardoso Pestana (orientador)**, **Karina Braga Gomes Borges (coorientadora)** e **Antônio Felipe Silva Carvalho (examinador)** participaram como membros da Comissão Examinadora da Monografia de Conclusão de Curso, intitulada **"Principais causas de reconvocações de usuários pelo laboratório de análises clínicas do Hospital das Clínicas da UFMG"**, apresentada pelo(a) aluno(a) **Ana Carolina Miranda Coelho**.

Belo Horizonte, 06 de Julho de 2022.

Professora Ana Paula Lucas Mota
Silva Menezes

Coordenadora do Colegiado do Curso de Biomedicina
Clínicas e Toxicológicas

Professora Cristiane Alves

Departamento de Análises



Documento assinado eletronicamente por **Cristiane Alves da Silva Menezes, Subcoordenador(a)**, em 06/09/2022, às 20:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Paula Lucas Mota, Coordenador(a) de curso**, em 08/09/2022, às 19:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1735724** e o código CRC **23A339E6**.

Referência: Processo nº 23072.240380/2022-99

SEI nº 1735724

09/09/2022 14:02

SEI/UFMG - 1590468 - Certificado



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
COLEGIADO DO CURSO DE BIOMEDICINA

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS, PARA OS DEVIDOS FINS, QUE **Rodrigo Mendonça Cardoso Pestana (orientador)**, **Karina Braga Gomes Borges (coorientadora)** e **Viviane de Figueiredo Pires** participaram como membros da Comissão Examinadora da Monografia de Conclusão de Curso, intitulada **“Avaliação da implementação da norma ISO 17025 no Laboratório Forense da Polícia Civil de Minas Gerais”**, apresentada pelo(a) aluno(a) **Nathália Christina Guimarães Sousa**.

Belo Horizonte, 05 de Julho de 2022.

Professora Ana Paula Lucas Mota

Professora Cristiane Alves Silva Menezes

Coordenadora do Colegiado do Curso de Biomedicina
Toxicológicas

Departamento de Análises Clínicas e



Documento assinado eletronicamente por **Ana Paula Lucas Mota**, Coordenador(a) de curso, em 10/08/2022, às 09:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1590468** e o código CRC **8EF748D5**.

Referência: Processo nº 23072.240380/2022-99

SEI nº 1590468

ANEXO XI

Participações em bancas de trabalhos de conclusão de curso (TCC) de graduação

13/10/2022 03:16

SEI/UFMG - 0832300 - Certificado



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
COLEGIADO DO CURSO DE BIOMEDICINA

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS, PARA OS DEVIDOS FINS, QUE a Profa. **KARINA BRAGA GOMES BORGES** e o Doutorando **RODRIGO MENDONÇA CARDOSO PESTANA**, participaram como membros da Comissão Examinadora da Monografia de Conclusão de Curso, intitulada *"Hemoglobina glicada no teste laboratorial remoto: comparação com os imunoensaios"*, apresentada pelo(a) aluno(a) **Bruna Lorrayne de Oliveira Jardim**.

Belo Horizonte, 01 de Setembro de 2021.

Professora **ANA PAULA LUCAS MOTA**
Coordenadora do Colegiado do Curso de Biomedicina
Faculdade de Farmácia/UFMG

Professora **CRISTIANE DA SILVA MENEZES**
Coordenadora da disciplina de Monografia de Conclusão de Curso
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Farmácia/UFMG



Documento assinado eletronicamente por **Ana Paula Lucas Mota, Coordenador(a) de curso**, em 03/09/2021, às 18:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cristiane Alves da Silva Menezes, Subcoordenador(a)**, em 06/09/2021, às 07:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0832300** e o código CRC **754CE92D**.

Referência: Processo nº 23072.23554/2021-11

SEI nº 0832300

13/10/2022 03:22

SEI/UFMG - 1590439 - Certificado



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
COLEGIADO DO CURSO DE BIOMEDICINA

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS, PARA OS DEVIDOS FINS, QUE **Karina Braga Gomes Borges (orientadora)**, **Viviani de Figueiredo Pires (coorientadora)** e **Rodrigo Mendonça Cardoso Pestana** participaram como membros da Comissão Examinadora da Monografia de Conclusão de Curso, intitulada **"Avaliação Dos Eventos Adversos E Dos Desfechos Clínicos Relacionados À Coleta De Amostras Biológicas Em Um Laboratório De Patologia Clínica"**, apresentada pelo(a) aluno(a) **Flávia de Lima Gramigna**.

Belo Horizonte, 07 de Julho de 2022.

Professora Ana Paula Lucas Mota

Professora Cristiane Alves Silva Menezes

Coordenadora do Colegiado do Curso de Biomedicina
Toxicológicas

Departamento de Análises Clínicas e



Documento assinado eletronicamente por **Ana Paula Lucas Mota, Coordenador(a) de curso**, em 10/08/2022, às 09:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1590439** e o código CRC **E28F4A8B**.

Referência: Processo nº 23072.240380/2022-99

SEI nº 1590439

ANEXO XII

Aprovação em Processo Seletivo Simplificado para Professor Substituto

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CAMPUS UNIVERSITÁRIO - TRINDADE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
CEP 88040-900 - FLORIANÓPOLIS - SANTA CATARINA
Tel. (48)3721-9712 – 3721-5072- e-mail: aci@contato.ufsc.br

Edital N° 77/2021/DDP

(Edital N° 77/2021/DDP Publicado no DOU no 177, Seção 3, páginas 86 e 87, em 17/09/2021)

A Comissão Examinadora do Processo Seletivo Simplificado para contratação de Professor Substituto por tempo determinado, do Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, de acordo com o Edital N° 77/2021/DDP Publicado no DOU no 177, Seção 3, páginas 86 e 87, em 17/09/2021 para o campo de conhecimento: Farmácia, Fisiopatologia e Diagnóstico Laboratorial Processo: 3080.036809/2021-65,

DIVULGA:

A Relação dos Candidatos Aprovados do Processo Seletivo Simplificado para contratação de Professor Substituto por tempo determinado.

NOME DO CANDIDATO	NOTA FINAL	CLASSIFICAÇÃO
Mariane Roberta Ritter	9,67	1
Júlia Cisilotto	8,94	2
Gabriella da Rosa Monte Machado	8,88	3
Rodrigo Mendonça Cardoso Pestana	8,56	4
Nádia Sandrine Ramos Santos Mota	8,54	5

Florianópolis, 06 de outubro de 2021.

 Documento assinado digitalmente
Eduardo Monguilhott Dalmarco
Data: 13/10/2021 17:42:44-0300
CPF: 907.886.489-34
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof. Eduardo Monguilhott Dalmarco
(Presidente)

 Documento assinado digitalmente
Iara Fabricia Kretzer
Data: 13/10/2021 13:13:19-0300
CPF: 006.010.419-84
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Profª Iara Fabricia Kretzer
(Membro Efetivo)

 Documento assinado digitalmente
Jussara Kasuko Palmeiro
Data: 13/10/2021 16:49:12-0300
CPF: 006.846.529-18
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Profª Jussara Kasuko Palmeiro
(Membro Efetivo)

 Documento assinado digitalmente
João Lucas de Siqueira Rosa
Data: 13/10/2021 15:48:12-0300
CPF: 387.225.958-05
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

João Lucas de Siqueira Rosa
(Secretário)

 Documento assinado digitalmente
Lucy Maria Bez Birolo Parucker
Data: 13/10/2021 10:36:19-0300
CPF: 223.874.209-34
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Profª Lucy Maria Bez Birolo Parucker
Chefe do Departamento de Análises Clínicas
Portaria: 922/2021/GR
SIAPE: 2160669

ANEXO XIII

Experiências como professor do magistério superior (substituto)

21/09/2021 15:13

SEI/UFVJM - 0469406 - Declaração Simplificada



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde
Departamento de Farmácia
Secretaria de Farmácia

DECLARAÇÃO SIMPLIFICADA

Nº 6/2021/SECFARMACIA/DFAR/FCBS

Nº PROCESSO 23086.002902/2021-16

A CHEFE DO DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA E BIOQUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI, no uso de suas atribuições regimentais, tendo em vista o que consta nos Processos SEI nº 23086.002902/2021-16 e 23086.007360/2021-78, declara para os devidos fins que **RODRIGO MENDONÇA CARDOSO PESTANA**, atuou como Professor do Magistério Superior - Substituto, Classe Auxiliar, para a área Bioquímica Básica e Clínica / Bioquímica Aplicada à Farmácia, Fundamentos de Citologia e Hematologia, Bioquímica Clínica e Estágio Curricular III, da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri/UFVJM, no período de 19 de julho de 2021 a 20 de setembro de 2021, em regime de trabalho de 40 horas semanais.

Diamantina, 21 de setembro de 2021.

ANDRÉA RENATA MALAGUTTI
Chefe do Departamento de Farmácia
DeFar/FCBS/UFVJM



Documento assinado eletronicamente por **Andrea Renata Malagutti, Chefe de Departamento**, em 21/09/2021, às 15:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufvjm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0469406** e o código CRC **0E54F1BE**.

Referência: Caso responda este Ofício, indicar expressamente o Processo nº 23086.002902/2021-16

SEI nº 0469406

Rodovia MGT 367 - Km 583, nº 5000 - Bairro Alto da Jacuba, Diamantina/MG - CEP 39100-000

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
Fundação Instituída nos termos da Lei nº 5.152, de 21/10/1966 – São Luís - Maranhão.
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - DCF



DECLARAÇÃO

A CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO, no uso de suas atribuições regimentais, tendo em vista o que consta nos Processos SEI nº. 23115.032678/2021-01 e 23115.010962/2022-07, declara para os devidos fins que **RODRIGO MENDONÇA CARDOSO PESTANA**, atua como professor do Magistério Superior – Substituto, Classe A - Assistente, para a área de Fisiologia, da Universidade Federal do Maranhão, no período de 29 de dezembro de 2021 até a presente data, em regime de trabalho de 40 horas semanais.

São Luís-MA, 13 de Outubro de 2022

Documento assinado digitalmente
gov.br
ADRIANA LEANDRO CAMARA
Data: 13/10/2022 15:15:54-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Profª. Drª. Adriana Leandro Camara
Chefe do Departamento de Ciências Fisiológicas/CCBS

ANEXO XIV**Comprovante de submissão artigo na Arquivos Brasileiros de Cardiologia:
'New cardiovascular biomarkers in breast cancer patients undergoing
doxorubicin-based hemotherapy'.**

30/03/2023, 11:30

Email – Rodrigo M C Pestana – Outlook

Arquivos Brasileiros de Cardiologia - Manuscript ID/ID do Manuscrito ABC-2023-0167

ABC Cardiol Admin <onbehalf@manuscriptcentral.com>

Seg, 06/03/2023 23:08

Para: karinabgb@gmail.com <karinabgb@gmail.com>

Cc: rodrigomcpestanda@hotmail.com <rodrigomcpestanda@hotmail.com>; juneapaolucci@gmail.com <juneapaolucci@gmail.com>; angelicanavarro@terra.com.br <angelicanavarro@terra.com.br>; esteves.cintia@yahoo.com.br <esteves.cintia@yahoo.com.br>; adriansabin01@gmail.com <adriansabin01@gmail.com>; rsimoes@cardiol.br <rsimoes@cardiol.br>; karinabgb@gmail.com <karinabgb@gmail.com>

Dear Dr. Braga Gomes:

Your manuscript entitled "NEW CARDIOVASCULAR BIOMARKERS IN BREAST CANCER PATIENTS UNDERGOING DOXORUBICIN-BASED CHEMOTHERAPY" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Arquivos Brasileiros de Cardiologia.

Your manuscript ID is ABC-2023-0167.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/abc-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/abc-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the Arquivos Brasileiros de Cardiologia.

Sincerely,
Editorial Office
Arquivos Brasileiros de Cardiologia

ANEXO XV

Comprovante de submissão artigo no Journal of Molecular and Cellular Cardiology: Microparticles and cardiotoxicity secondary to doxorubicin-based chemotherapy in breast cancer patients

13/03/2023, 08:53

Email – Rodrigo M C Pestana – Outlook

Confirm co-authorship of submission to Journal of Molecular and Cellular Cardiology

JMCC <em@editorialmanager.com>

Dom, 12/03/2023 15:19

Para: Rodrigo M. C. Pestana <rodrigomcpestana@hotmail.com>

*This is an automated message. *

Journal: Journal of Molecular and Cellular Cardiology

Title: Microparticles and cardiotoxicity secondary to doxorubicin-based chemotherapy in breast cancer patients

Corresponding Author: Dr Karina Braga Braga Gomes

Co-Authors: Rodrigo M. C. Pestana; Andréa Teixeira-Carvalho; Luara I. dos Santos; Angélica N. Oliveira; Cintia E. Soares; Adriano P. Sabino; Ricardo Simões

Manuscript Number: JMCC15504

Dear Rodrigo M. C. Pestana,

Dr Karina Braga Braga Gomes submitted this manuscript via Elsevier's online submission system, Editorial Manager, and you have been listed as a Co-Author of this submission.

Elsevier asks Co-Authors to confirm their consent to be listed as Co-Author and track the papers status. In order to confirm your connection to this submission, please click here to confirm your co-authorship:

[Yes, I am affiliated.](#)

If you have not yet registered for the journal on Editorial Manager, you will need to create an account to complete this confirmation. Once your account is set up and you have confirmed your status as Co-Author of the submission, you will be able to view and track the status of the submission as it goes through the editorial process by logging in at

<https://www.editorialmanager.com/jmcc/>

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author directly at karinabgb@gmail.com

Thank you,

Journal of Molecular and Cellular Cardiology