



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA**



Joseanne Daniele Cezar Ribeiro

**EFEITOS DA ANGIOTENSINA-(1-7) NA TOXICIDADE INDUZIDA POR
TRATAMENTO COM DOXORRUBICINA**

**João Pessoa – PB
2018**

Joseanne Daniele Cezar Ribeiro

Área de Concentração: BIOTECNOLOGIA APLICADA À SAÚDE
Linha de Pesquisa: DESENVOLVIMENTO DE AGENTES TERAPÊUTICOS,
PROFILÁTICOS E DE DIAGNÓSTICO

Título da Dissertação:
EFEITOS DA ANGIOTENSINA-(1-7) NA TOXICIDADE INDUZIDA POR
TRATAMENTO COM DOXORRUBICINA

Apresentação da Dissertação de
mestrado ao Programa de Pós-
graduação do Centro de Biotecnologia
da Universidade Federal da Paraíba
como requisito final para obtenção do
título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Enéas Ricardo de Moraes Gomes

**João Pessoa – PB
2018**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

R484e Ribeiro, Joseanne Daniele Cezar.

EFETOS DA ANGIOTENSINA-(1-7) NA TOXICIDADE INDUZIDA
POR TRATAMENTO COM DOXORRUBICINA / Joseanne Daniele
Cezar Ribeiro. – João Pessoa, 2019.

51 f. : il.

Orientação: Enéas Ricardo de Moraes Gomes.

Dissertação (Mestrado) – UFPB/Biotecnologia.

1. Ang-(1-7), Doxorubicina, Cardiotoxicidade. I.
Gomes, Enéas Ricardo de Moraes. II. Título.

UFPB/BC

Joseanne Daniele Cezar Ribeiro

**EFEITOS DA ANGIOTENSINA-(1-7) NA TOXICIDADE INDUZIDA POR
TRATAMENTO COM DOXORRUBICINA**

Dissertação de mestrado aprovada em: 23/11/2018.

BANCA EXAMINADORA



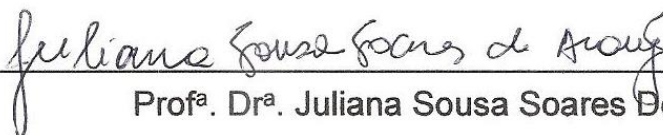
Prof. Dr. Enéas Ricardo de Moraes Gomes

Presidente



Prof. Dr. Ian Porto Gurgel Do Amaral

Membro



Profª. Dra. Juliana Sousa Soares De Araújo

Membro

AGRADECIMENTOS

Gratidão. Um dia eu descobri que não há razão para se alegrar debaixo do céu, que não seja vivendo a vontade de Deus, que nEle e com Ele habita a única força que não me permitiu desistir nos momentos difíceis, pois a minha vocação para a docência já havia sido traçada por Ele, quando suscitou em meu coração, ainda quando pequena, a vontade de ensinar. Por isso, como diz na carta de São Paulo aos Colossenses, capítulo 2, versículos 6 e 7: "Como (de nossa pregação) recebestes o Senhor Jesus Cristo, vivei nele, enraizados e edificados nele, inabaláveis na fé em que fostes instruídos, com o coração a transbordar de gratidão!", me recordo a viver como membro daquela comunidade, e ser grata (a nível de transbordar) a Deus por todas as coisas, assim como também pela intercessão de Nossa Senhora, que sempre roga por sua filha junto aos olhos do nosso Salvador.

Aos meus pais, Rita e José, minha gratidão terna e incalculável, por terem me mostrado, por toda vida, que o amor infinito é capaz de existir. Agradeço por terem me acompanhado de perto em todas as minhas lutas, e agora em mais uma etapa concluída. Não seria possível colocar nem em todas as linhas imagináveis minha gratidão por ter vocês. E ao meu irmão Danillo, por me animar e cuidar de mim nos momentos em que mais precisei, e por fazer de nós quatro uma família completa, unida e feliz.

"Você consegue!". Obrigada ao meu namorado Hugo, que com essa frase não me deixou me render aos desestímulos daqueles que não compreendiam minhas dificuldades em uma área que era tão nova para mim. E deu muito certo! Gratidão, pois se não fosse por você, seu cuidado, sua compreensão, sua prontidão em me ajudar, e sua insistência na minha capacidade de vencer, não teria sido possível nem que essa etapa tivesse sido iniciada, quando na correria daquele 23 de novembro de 2016, uniu suas forças às minhas para fazer minha inscrição numa seleção que um dia me permitiria viver meus sonhos. Muito obrigada!

Aos meus amigos coordenadores e servos da Crisma de Fátima, companheiros de serviço e fé, por todas as vezes que foram meu refúgio, por vibrarem com mais uma vitória, por me alegrarem, viverem e compartilharem comigo momentos que fortalecem meu espírito, por fazerem parte de um Sim que mudou e muda diariamente a minha vida. Sou feliz por ter encontrado vocês, e por Deus fazer de vocês minha segunda família.

Às minhas companheiras de coordenação do Ministério Filhos de Maria por todas as orações derramadas sobre mais essa etapa da minha vida, e a todas as crianças que em sua simplicidade me mostram o motivo de minha jornada aqui na terra.

Obrigada ao meu professor e orientador Enéas por todo acolhimento, e principalmente pela compreensão e paciência, por não ter desistido de mim diante de minhas falhas, e por ser inspiração de profissional e de pessoa para todos os que o rodeiam, especialmente para mim. Foi uma honra poder adquirir tantos novos aprendizados por seu intermédio. E aos demais colegas e integrantes do Núcleo de Pesquisa Experimental e Clínica em Cardiologia, agradeço por serem sempre tão solícitos e me auxiliarem tanto nessa fase da minha vida. Um agradecimento particular a Renata e Andrezza, por toda paciência, obrigada por me ensinarem tanto na biotecnologia e no companheirismo, e a Valério, por contribuir conosco com seu amplo conhecimento sobre a Cardiologia, e mais ainda por sua solidariedade e constante espontaneidade que contagia a todos. Sou muito grata.

Aos professores e colegas que passaram por meu caminho durante esses 2 anos de mestrado obrigada por todas as experiências, partilhas de conhecimento, e por tudo o que acrescentaram na minha bagagem de aprendiz.

Agradeço à professora Thais Josy pela oportunidade de vivenciar a experiência do estágio docência que tanto sonhei. Obrigada por toda solicitude e carinho!

O meu muito obrigada ao Diretor Técnico e Clínico Dr. Fernando Antonio de Carvalho e ao Farmacêutico Jadson Gomes Dantas por toda atenção em nos ajudar a realizar nossos experimentos nos fornecendo os materiais necessários.

A todos que fazem parte do Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular por poder usufruir do espaço, dos materiais e da boa vontade de cada um.

Aos professores Ian Porto e Juliana Sousa pelo privilégio de contar com a colaboração dos senhores em minha banca. Não haveria pessoas melhores. Muito obrigada pela disponibilidade.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos nos últimos meses do curso de mestrado.

A todos que passaram por minha vida durante esses dois anos e antes deles, meus amigos de infância, os amigos que permaneceram comigo após a graduação, os professores e fisioterapeutas que me estimularam a seguir o caminho da docência,

obrigada por plantarem em meu coração um pouco da confiança e do cuidado de vocês.

À vida, aos acontecimentos bons e ruins permitidos por Deus, que me deixaram as marcas que me fazem ser quem sou hoje, uma serva de Deus, filha, irmã, namorada, amiga, aluna e fisioterapeuta, alguém que com certeza aprende cada dia a ser ainda mais cuidadosa com o próximo, e uma futura professora que, acima de tudo, reconhece sempre que o conhecimento se adquire quando a gente se permite viver o lado do outro, e que, na pós-graduação em biotecnologia, compreendeu que são os desafios que constroem um bom professor.

Minha sincera gratidão.

Epígrafe

***“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente
você estará fazendo o impossível.”***

São Francisco de Assis

EFEITOS DA ANGIOTENSINA-(1-7) NA TOXICIDADE INDUZIDA POR TRATAMENTO COM DOXORRUBICINA

Angiotensin-(1-7) effects in toxicity induced by doxorubicin treatment

Joseanne Daniele Cezar Ribeiro¹, Prof. Dr. Enéas Ricardo de Moraes Gomes²

¹Pós-graduanda do curso de mestrado em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba – UFPB, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

²Docente do Departamento de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba – UFPB, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

Conforme dados do Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), no biênio 2018-2019, para cada ano, aproxima-se um valor de 600 mil novos casos de câncer no Brasil. Como saída terapêutica para atingir o importante número populacional acometido por essa doença, existem os antibióticos antitumorais, agentes antineoplásicos onde está inserida a doxorubicina. Apesar de sua eficácia no combate às células tumorais, sua utilização pode provocar reações adversas como a cardiotoxicidade. Nas abordagens farmacológicas uma substância que tem potencial no quesito proteção cardíaca é a Angiotensina-(1-7), um heptapeptídeo endógeno participante do sistema renina-angiotensina. Diante disso, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da Angiotensina-(1-7) na prevenção e tratamento da toxicidade provocada pela Doxorubicina. Neste estudo foram utilizados 35 ratos Wistar adultos (*Rattus norvegicus*), pesando de 160-278g, provenientes do Biotério Prof. Thomas George da Universidade Federal da Paraíba. Os animais passaram por um ciclo de seis semanas de experimentação, sendo divididos em 6 grupos: Controle Solução salina, Controle Ang-(1-7), Controle doxorubicina, Preventivo 1 e 2, e grupo Tratamento. Os animais foram submetidos a 3 avaliações ecocardiográficas ao longo dessas semanas e ao final do tratamento foram eutanasiados, com posterior avaliação do peso dos seguintes órgãos: coração, pulmão, rins (D e E), baço e fígado, além da análise do aspecto morfológico macroscópico do organismo dos animais (com registro fotográfico). Na avaliação da sobrevivência os grupos Controle Solução salina e Controle Ang-(1-7) chegaram ao final do experimento com todos os animais vivos, diferente dos grupos de tratamento que receberam Ang-(1-7) e doxorubicina. Nos grupos controle Doxo e Tratamento houve uma queda no valor da massa corporal dos animais, além de características como apatia, desidratação e fezes diarreicas com muco. O grupo Controle Solução Salina na avaliação da necropsia apresentou uma morfologia com focos hemorrágicos nos pulmões, manchas brancas em ambos os rins e apenas em um dos ratos desse grupo foi capaz de observar a normalidade morfológica macroscópica. O grupo Controle Ang-(1-7) apresentou características morfológicas normais. Os animais dos grupos que receberam a doxorubicina apresentaram rigidez característica nos órgãos, em especial no fígado, além do acúmulo de líquido na cavidade peritoneal e focos hemorrágicos em pulmões. Em relação à função ventricular esquerda os animais demonstraram um perfil semelhante entre os grupos de tratamento comparado ao grupo Controle. No que compete a avaliação da massa dos órgãos dos animais analisados, o grupo Controle Ang-(1-7) se comportou igual ao grupo Controle Solução salina. A massa cardíaca isolada apresentou redução nos grupos Controle doxorubicina, Preventivo 1 e Tratamento,

mas em relação à massa corporal, verificou-se que a proporção não foi alterada entre os grupos. A massa pulmonar isolada mostrou-se alterada nos grupos Preventivo 1 e Preventivo 2 e na relação massa do órgão/massa corporal do animal esse aumento no volume pulmonar também pode ser observado nos grupos Controle doxorrubicina e Tratamento. O baço dos animais apresentou alteração apenas no grupo Preventivo 2. Não encontramos diferença na massa dos rins (D e E) entre os grupos de tratamento, mas constatamos que se observado a relação massa do órgão/massa corporal houve aumento nos grupos que receberam apenas a doxorrubicina no início do experimento. Por fim, a massa do fígado dos animais também não apresentou diferença entre os grupos quando observado isoladamente, mas quando considerada a massa corporal do animal os grupos Controle doxorrubicina, Preventivo 1 e Tratamento manifestaram uma diferença importante do grupo Controle Solução salina. Diante dos resultados encontrados não foi possível analisar prevenção de cardiotoxicidade pela Ang-(1-7), e que quando administrada em associação com a doxorrubicina os efeitos foram demasiadamente deletérios.

Palavras-chave: Angiotensina-(1-7), Doxorrubicina, Cardiotoxicidade.

ABSTRACT

According to data from the National Cancer Institute José Alencar Gomes da Silva (INCA), in the biennium 2018-2019, for each year, a value of 600 thousand new cancer cases in Brazil is approaching. As therapeutic output to reach the important population number affected by this disease, there are antitumor antibiotics, antineoplastic agents where doxorubicin is inserted. Despite its effectiveness in fighting tumor cells, its use may cause adverse reactions such as cardiotoxicity. In pharmacological approaches, a substance that has potential in the area of cardiac protection is Angiotensin- (1-7), an endogenous heptapeptide that participates in the renin-angiotensin system. Therefore, the objective of this study was to investigate the effects of Angiotensin- (1-7) on the prevention and treatment of toxicity caused by Doxorubicin. In this study 35 adult Wistar rats (*Rattus norvegicus*), weighing 160-278g, were used from the Biotério Prof. Thomas George of the Federal University of Paraíba. The animals went through a cycle of six weeks of experimentation, being divided into 6 groups: Control Saline, Control Ang- (1-7), Control doxorubicin, Preventive 1 and 2, and Treatment group. The animals were submitted to 3 echocardiographic evaluations during these weeks and at the end of the treatment were euthanized, with subsequent evaluation of the following organs weight: heart, lung, kidneys (L and R), spleen and liver, besides morphological analysis macroscopic examination of the animals organism (with photographic record execution). In the evaluation of survival, the Control Saline Solution group and Control Ang-(1-7) arrived at the end of the experiment with all live animals, in opposition to the treatment groups that received Ang-(1-7) and doxorubicin. In the Doxo and Treatment control groups there was a decrease in the body mass value of the animals, besides characteristics such as apathy and dehydration and diarrheal feces with mucus. The control group Saline Control in the evaluation of the necropsy presented a morphology with hemorrhagic foci in the lungs, white patches in both kidneys and only one of the rats of this group was able to observe macroscopic morphological normality. The control Ang-(1-7) group presented normal morphological characteristics. The animals in the groups receiving doxorubicin had characteristic stiffness in the organs, especially in the liver, besides the accumulation of fluid in the peritoneal cavity, hemorrhagic foci in the lungs and in one animal there was an increase in the seminal vesicles and gallbladder, it is noteworthy that in the groups in which Ang- (1-7) interaction with doxorubicin also showed an increase in lung volume. Regarding left ventricular function, the animals showed a similar profile between the treatment groups and about the structure there was a decrease in the diastolic diameter, interventricular septum and posterior wall of the left ventricle compared to the Control group. The control group Ang- (1-7) behaved the same as the Control group, showing that Ang- (1-7), when administered alone, does not promote changes in the organs. Isolated heart mass showed a reduction in the groups Control doxorubicin, Preventive 1 and Treatment, but in relation to the body mass, we verified that the proportion was not altered between the groups. The isolated lung mass was altered in the Preventive 1 and Preventive 2 groups and in the organ mass/body mass ratio of the animal, this increase in lung volume can also be observed in the Control doxorubicin and Treatment groups. The spleen of the animals presented alteration only in Preventive 2 group. We did not find any difference in the kidney mass (L and R) between the treatment groups, but we observed that if the organ mass/body mass ratio was observed, there was an increase in the groups that received only doxorubicin at the beginning of the experiment. Finally, the liver mass of the animals did not show any difference between the groups when

observed alone, but when considered the body mass of the animal, the groups Control doxorubicin, Preventive 1 and Treatment showed an important difference of the Control Saline group. In view of the results it was not possible to analyze the prevention of cardiotoxicity by Ang- (1-7), and when administered in combination with doxorubicin the effects were too deleterious.

Key-words: Angiotensin-(1-7), Doxorubicin, Cardiotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Delineamento experimental.....	22
Figura 2. Ecocardiografia – Análise em modo Monodimensional.....	24
Figura 3. Coração com acúmulo de sangue nos átrios.....	29
Figura 4. Efeito deletério nos pulmões.....	29
Figura 5. Acúmulo de líquido em região peritoneal.....	29
Figura 6. Visão geral: Morfologia macroscópica orgânica dos grupos estudados....	30
Figura 7. Focos hemorrágicos em pulmões.....	31
Figura 8. Manchas brancas em rins D e E.....	31
Figura 9. Crescimento das vesículas seminais e biliar.....	32
Figura 10. Características morfológicas do grupo tratamento.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de animais pré e pós-experimentação.....	26
--	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Curva de mortalidade.....	27
Gráfico 2. Massa corporal inicial e final dos animais.....	28
Gráfico 3. Ecocardiografia – Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo.....	34
Gráfico 4. Ecocardiografia – Septo interventricular do ventrículo esquerdo.....	34
Gráfico 5. Ecocardiografia – Parede posterior do ventrículo esquerdo.....	34
Gráfico 6. Ecocardiografia – Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo.....	35
Gráfico 7. Ecocardiografia – Fração de ejeção do ventrículo esquerdo.....	36
Gráfico 8. Massa do coração isolada e a relação com a massa corporal do animal.....	36
Gráfico 9. Massa do pulmão isolada e a relação com a massa corporal do animal.....	37
Gráfico 10. Massa do baço isolada e a relação com a massa corporal do animal.....	38
Gráfico 11. Massa do rim direito isolada e a relação com a massa corporal do animal.....	38
Gráfico 12. Massa do rim esquerdo isolada e a relação com a massa corporal do animal.....	39
Gráfico 13. Massa do fígado isolada e a relação com a massa corporal do animal.....	39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. <i>A doxorubicina</i>	14
1.1.1. A doxorubicina inserida no tratamento do câncer.....	14
1.1.2. Principais efeitos adversos e a cardiotoxicidade.....	15
1.2. <i>A angiotensina-(1-7)</i>	17
1.2.1. Um heptapeptídeo do sistema renina-angiotensina.....	17
1.2.2. Angiotensina e proteção cardíaca.....	18
1.3. <i>Impacto social e econômico do estudo</i>	20
2. OBJETIVOS.....	21
2.1. <i>Geral</i>	21
2.2. <i>Específicos</i>	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1. <i>Animais</i>	22
3.2. <i>Grupos experimentais e tratamento dos animais</i>	22
3.2.1. Registro da massa corporal dos animais.....	23
3.3. <i>Ecocardiografia: Avaliação da função ventricular</i>	23
3.4. <i>Necropsia</i>	24
3.4.1. Análise morfológica macroscópica.....	24
3.4.2. Avaliação da massa dos órgãos.....	24
3.5. <i>Análise de dados</i>	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1. <i>Curva de Mortalidade</i>	26
4.2. <i>Massa corporal dos animais</i>	27
4.3. <i>Morfologia macroscópica orgânica</i>	28
4.4. <i>Função ventricular cardíaca</i>	33
4.5. <i>Massa dos órgãos necropsiados</i>	36
5. CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS.....	41
ANEXO – Parecer CEUA/UFPB.....	48

1. INTRODUÇÃO

1.1. A doxorubicina

1.1.1. A doxorubicina inserida no tratamento do câncer

Responsável por 9,6 milhões de mortes no mundo em 2018, o câncer, que pertence à classe de doenças e agravos não transmissíveis, é a segunda principal causa de morte, sendo, em nível global, um em cada seis óbitos causados por essa doença (OMS – Organização Mundial de Saúde, 2018). Conforme dados do Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), no biênio 2018-2019, para cada ano, aproxima-se um valor de 600 mil novos casos de câncer no Brasil. Como saída terapêutica para atingir o importante número populacional acometido por essa doença, existem os antibióticos antitumorais, agentes antineoplásicos onde está inserida a doxorubicina (Doxo), que juntamente com a daunorrubicina, epirubicina, mitoxantrona e idarrubicina fazem parte da classe das antraciclinas (CRUZ e col., 2016), e estão entre as drogas mais eficazes no tratamento de diversos tumores sólidos, com destaque para o câncer de mama e o linfoma, e de malignidades hematológicas (GHEBEH e col., 2010; SMITH e col., 2010; CARDINALE e col., 2015; MENNA e SALVATORELLI, 2017).

Há quase 50 anos, a doxorubicina ou adriamicina (primeira droga da classe das antraciclinas a ser utilizada na prática clínica) foi isolada da bactéria *Streptomyces peucetius* e vem sendo alvo de novas estratégias de produção desde então (WANG e col., 2018). Atua no mecanismo anticâncer por três principais modos: 1. Inibição da topoisomerase II – principalmente na isoforma alfa, quando seu complexo tóxico DNA – TOPII – DOXO interrompe a resselagem do DNA, por sua ação não-covalente na interface proteína-DNA, impedindo a replicação e induzindo a apoptose das células malignas (MCCLENDON e OSHEROFF, 2007; CORREMANS e col., 2018); 2. Intercalação – a doxorubicina impede a transcrição do RNA e a replicação do DNA, devido sua ligação ao DNA, no núcleo da célula captada, por intercalação (CORREMANS e col., 2018); e 3. Estresse oxidativo – já que em seu metabolismo promove liberação de radicais livres, que pode levar ao dano no DNA e morte celular (CORREMANS e col., 2018).

1.1.2. Principais efeitos adversos e a cardiotoxicidade

Os agentes alquilantes, antimetabólicos, antibióticos e inibidores mitóticos, fazem parte das principais quimioterapias utilizadas como solução para o câncer. A adriamicina ou doxorrubicina (agente antibiótico), assim como os outros agentes quimioterápicos, além de combater as células neoplásicas, atuam também nas células saudáveis, provocando efeitos adversos. Eles atingem principalmente estruturas que se renovam regularmente, como a mucosa intestinal, a medula óssea e os pelos (INCA, 2003).

Segundo a Sociedade Americana do Câncer (2016), os efeitos adversos provocados pela quimioterapia envolvem desde mudanças no humor ou pensamento, fadiga, dor, a, até mesmo, problemas de pele, ou em relação ao sono e etc. No caso do câncer de mama, por exemplo, onde a doxorrubicina é usada como uma das principais drogas para seu tratamento, os efeitos adversos mais comuns são: alopecia, perda de apetite, mudança nas unhas, mucosite, náuseas e vômitos. Além desses, existem alguns efeitos mais específicos, como mudanças menstruais e problemas de fertilidade, neuropatia, disfunção mental, aumento do risco de leucemia, síndrome mão-pé e também a cardiotoxicidade, a qual é provocada pelo uso das antraciclinas.

A cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina pode ser aguda, subaguda, crônica ou tardia (MATSUBARA e FERREIRA, 2005). A toxicidade tardia ocorre anos após o término da quimioterapia, mesmo com doses de doxorrubicina consideradas menores (inferiores a 480mg/m^2) (WOJTACKI e col., 2000). Pode ocorrer insuficiência cardíaca, arritmias ou alterações da condutividade. A morte ocorre por falência ventricular, sendo rara a ocorrência de morte súbita. Conforme estudo de STEINHERZ e col. (1991), 38% dos pacientes, acompanhados por mais de 10 anos após o uso da doxorrubicina, apresentavam diminuição da fração de ejeção, enquanto 18% tinham a mesma alteração com menos de 10 anos do uso da droga.

A toxicidade crônica manifesta-se com quadro clínico típico de insuficiência cardíaca, o qual se desenvolve semanas a meses após o término da quimioterapia, principalmente nos pacientes que receberam dose total maior que 550 mg/m^2 . É, sem dúvida, a mais conhecida e estudada, devido às repercussões clínicas mais importantes (STEINHERZ e col., 1991). Nos casos de doses cumulativas de $500\text{-}550\text{ mg/m}^2$ a incidência de cardiomiopatia é de 4%, para doses de $551\text{-}600\text{ mg/m}^2$

demonstra-se um número de 18%, e chega a 36%, dependendo da variabilidade dos indivíduos, para as doses que excedem os 600 mg/m² (LEFRAK, 1973).

Embora mais rara, a cardiotoxicidade subaguda é descrita como ocorrendo em dias a semanas após o uso da doxorubicina e manifesta-se como pericardite e/ou miocardite (STEINHERZ e col., 1991). Não está descartada que essa forma de apresentação tenha frequência subestimada em decorrência da falta de diagnóstico.

A toxicidade aguda ocorre durante o tratamento e pode ser assintomática. Quando se manifesta clinicamente, são observadas alterações eletrocardiográficas como alterações inespecíficas da repolarização ventricular, complexos de baixa voltagem, taquicardia sinusal, extrassístoles ventriculares e supraventriculares e prolongamento do segmento QT (VILLANI e col., 1985). Essas alterações inespecíficas não implicam em suspensão do tratamento. A morte súbita é descrita em menos de 1% dos casos e não há relação direta entre dose ou forma de administração e a presença de cardiotoxicidade, em contraste ao que ocorre na toxicidade crônica.

ICHIKAWA e col. (2014) revelam que parte da cardiotoxicidade provocada pela doxorubicina está ligada ao complexo ferro-doxorubicina no miocárdio, que produz um radical livre semiquinona pela oxidação da porção aglicona. Acrescentam ainda que a doxorubicina acumula nas mitocôndrias, e isso leva ao aumento dos níveis de ferro nessa organela, e em consequência a esse aumento é que ocorrem os danos provocados pela droga.

Acredita-se também que a ligação da doxorubicina ao DNA da célula cardíaca promova alteração na síntese protéica e consequentes alterações funcionais e estruturais nos miócitos (LAMBERTENGHI-DELILIERIS e col., 1976). Um estudo realizado com pacientes de alto risco, portadores de Leucemia linfoblástica aguda, confirma a ação deletéria que a terapia com doxorubicina apresenta sobre o número de DNA mitocondrial (LIPSHULTZ e col., 2016). LAMBERTENGHI-DELILIERIS e col. (1976) já haviam demonstrado há algum tempo, que após 14 horas da administração da droga, eram registradas áreas de degeneração focal, caracterizadas por lesão mitocondrial e alargamento das cisternas.

SOUZA e col. (2009) ainda complementam esses dados quando, em análises dos efeitos agudos, observaram em seus resultados a indicação de ocorrência de disfunção ventricular sistólica e diastólica induzida pela doxorubicina.

1.2. A angiotensina-(1-7)

1.2.1. Um heptapeptídeo do sistema renina-angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) tem um papel vital na regulação de processos fisiológicos do sistema cardiovascular, não apenas funcionando como um sistema endócrino, mas também com funções parácrinas e autócrinas nos tecidos e órgãos (MEHTA e col., 2006). Na visão tradicional o SRA é visto como um sistema endócrino clássico, tendo um octapeptídeo, a angiotensina II (Ang II), como seu hormônio efetor, exercendo efeitos vasoconstritores, de retenção de sódio, mitogênico e efeitos proliferativos, em consequência da sua ligação ao receptor de Ang II do tipo 1 (AT1). A renina e a enzima conversora de angiotensina (ECA) eram conhecidas como as únicas enzimas responsáveis pela síntese de Ang I e Ang II respectivamente. Entretanto, através das últimas duas décadas, um corpo crescente de evidências tem indicado uma complexidade muito maior desse sistema, particularmente em tecidos como o coração e o rim. As evidências de um SRA local completamente operacional em tecidos específicos, com vias enzimáticas para processamento da Ang I e Ang II têm sido detalhadas em inúmeras publicações (VARAGIC e col., 2008). Além disso, os múltiplos efeitos de um fragmento resultante da clivagem da Ang I ou Ang II, o heptapeptídeo Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)], têm sido gradativamente apreciados ao longo da última década (MARQUES e col., 2011; VARAGIC e col., 2008).

O SRA tem mostrado ter participação no surgimento de doenças cardiovasculares como a hipertensão, doenças coronarianas, miocardites e insuficiência cardíaca (DOSTAL e col., 1999). A Ang II e Ang-(1-7) são os dois principais peptídeos ativos deste sistema, exercendo ações, na maioria das vezes, antagônicas sobre a fisiologia cardiovascular (MACHADO e col, 2000; KOSTENIS e col., 2005), com a Ang-(1-7) contrabalanceando ações biológicas da Ang II. Nesse sentido, um balanço inadequado desses dois peptídeos pode determinar diferentes estados fisiopatológicos no sistema cardiovascular (VARAGIC e col., 2008), podendo exercer papel fundamental no surgimento da hipertensão essencial (BENTER e col., 1995). Os mecanismos de controle e degradação desses peptídeos são importantes na determinação dos efeitos fisiológicos finais.

A Ang II é formada da clivagem enzimática do angiotensinogênio em Ang I pela renina, com subsequente conversão da Ang I em Ang II pela enzima conversora de angiotensina (ECA). A enzima conversora de angiotensina (2) (ECA 2), uma

carboxipeptidase, cliva a Ang II em Ang-(1-7), e a Ang I em Ang-(1-9), que pode ser posteriormente clivada através da ECA em Ang-(1-7) (CRACKOWER e col., 2002). Temos ainda, as quimases e algumas endopeptidases que também fazem parte desse sistema de clivagens do SRA. Além disso, um pró-peptídeo, a angiotensina-(1-12) também foi identificada no organismo, com expressão local no coração, e tem sido sugerida como substrato alternativo ao angiotensinogênio para o SRA (JESSUP e col., 2008; TRASK e col., 2008).

1.2.2. Angiotensina e proteção cardíaca

A Ang-(1-7), na maioria das vezes, exerce ações contrárias à Ang II (FERRARIO e col., 1997; SANTOS e col., 2000; KOSTENIS e col., 2005). A Ang-(1-7) aumenta a sensibilidade do barorreceptor (CAMPAGNOLE-SANTOS e col., 1992; BRITO e col., 1997; COUTO e col., 2002) e potencializa o efeito vasodilatador da bradicinina (PAULA e col., 1995; ABBAS e col., 1997; FERNANDES e col., 2005) e do Óxido Nítrico (NO) (PORSTI e col., 1994; BROSNIHAN e col., 1996; MACHADO e col., 2000; HEITSCH e col., 2001). Também tem sido demonstrado efeitos anti-trombóticos da Ang-(1-7), através da liberação de NO pelas plaquetas (FRAGA-SILVA e col., 2008), bem como em células endoteliais.

A síntese local de Ang-(1-7) no coração foi primeiramente detectada em cães após isquemia aguda do miocárdio (SANTOS e col., 1990). Desta forma, surgiam as primeiras evidências de que o dano tecidual cardíaco é um estímulo para formação local de um sistema contra-regulatório mediado pela Ang-(1-7), sendo a ECA 2, a principal enzima envolvida na formação deste peptídeo no coração (CRACKOWER e col., 2002).

Diversos estudos têm mostrado que a Ang-(1-7) inibe os efeitos deletérios locais da Ang II (FERRARIO e col., 1997; GROBE e col., 2006; GIANI e col., 2007). A ação local da Ang-(1-7) especificamente no coração tem sido proposta em diversos trabalhos. Dentre estes, GROBE e col. (2006) mostraram que a Ang-(1-7) previne o surgimento de fibrose cardíaca sem alteração dos níveis pressóricos sistêmicos de ratos hipertensos. Sendo assim, o coração tem sido considerado um dos principais alvos de estudo das ações da Ang-(1-7). DIAS-PEIXOTO e col. (2008) mostraram que a Ang-(1-7) promove estimulação da eNOS e aumenta a produção de NO diretamente

no cardiomiócito ventricular e que além disso, animais deficientes no receptor Mas apresentam deficiência na sinalização intracelular de Ca^{2+} em seus cardiomiócitos.

De um modo geral, um dos caminhos pelos quais há comprometimento da função miocárdica é pela perda de cardiomiócitos (PASUMARTHI e FIELD, 2002). Assim, uma outra alternativa que vem sendo estudada com o intuito de restaurar essa função seria por meio da proliferação de cardiomiócitos para repor os cardiomiócitos perdidos.

Vale considerar ainda que a Ang-(1-7) já vem sendo utilizada em ensaios clínicos como fármaco anti-hipertensivo, demonstrando a viabilidade de utilização deste peptídeo na clínica médica.

Um ponto importante relacionado à proliferação de cardiomiócitos refere-se às vias de sinalização envolvidas nesse processo. KÜHN e col. (2007) demonstraram que a periostina e o fator de crescimento de fibroblastos (FCF) ativam a proliferação de cardiomiócitos numa via dependente da fosfatidilinositol 3 quinase (PI3-K). Em outra abordagem, BERSELL e col. (2009) observaram que a neuregulina, outro estimulador da proliferação cardíaca também utiliza a via da PI3-K para produzir esses efeitos. Anteriormente, MCDEVITT e col. (2005) já haviam mostrado que a proliferação de cardiomiócitos derivados de células-tronco embrionárias humanas utilizavam a via da PI3-K para mediar a proliferação dessas células. Sendo assim, em conjunto essas informações sugerem que diferentes fatores extracelulares induzem a proliferação de cardiomiócitos ativando vias de sinalização que convergem para a ativação da PI3-K.

Por outro lado, considerando-se que as quinases ativadas por mitógeno (MAPK) têm um papel determinante na proliferação de diversos tipos celulares, essa via de sinalização foi foco de análise de alguns estudos, contudo, demonstrou-se que a inibição da MAPKK não interferiu no processo proliferativo (MCDEVITT e col., 2005). Corroborando esse achado, KÜHN e col. (2007) viram que a inibição da MAP quinase ERK 1/2 (quinase regulada por sinal extracelular) também não teve nenhum efeito sobre a resposta proliferativa de cardiomiócitos induzida por periostina. Já ENGEL e col. (2005) observaram que a reentrada de cardiomiócitos no ciclo celular induzida pelo fator de crescimento de fibroblastos (FCF) é potencializado com a inibição da MAP quinase p38.

Visto determinadas colocações anteriores, estudos desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa, investigando tais efeitos cardioprotetores da Ang-(1-7), demonstraram que esse peptídeo exerce ações protetoras diretamente no cardiomiócito ventricular, por uma via de sinalização dependente de NO, e que o aumento de NO nessas células é consequência do aumento de atividade da PI3-K, sendo a PI3-K estimulada pela Ang-(1-7) (DIAS-PEIXOTO e col., 2008; GOMES e col., 2010). Além disso, já é bem demonstrado na literatura que a Ang-(1-7) antagoniza a via das MAP quinases (TALLANT e col., 2005; YAMAMOTO e col., 2006; GALLAGHER e col., 2008), e como foi observado previamente, dependendo do estímulo, a inibição das MAP quinases potencializa a atividade proliferativa dos cardiomiócitos (ENGEL e col., 2005).

1.3. Impacto social e econômico do estudo

Este estudo reflete a descoberta de aspectos importantes no que compete o tratamento de doenças que aparecem de forma relevante no cenário da saúde no Brasil e no mundo, como é o caso do câncer e das doenças cardíacas. Visto isso, é considerável saber que os resultados dessa pesquisa ajudarão profissionais que estão envolvidos nesse contexto, e, como consequência, os indivíduos que precisam desse tipo de tratamento.

Ademais, o Brasil carece do desenvolvimento de novas tecnologias e produtos de alta eficiência e baixo custo para tratamento de doenças crônicas, passíveis de utilização no Sistema Único de Saúde (SUS).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

- ❖ Investigar os efeitos da Angiotensina-(1-7) na prevenção e tratamento da toxicidade provocada pela Doxorubicina.

2.2. Específicos

- ❖ Avaliar o perfil ecocardiográfico e de morfologia macroscópica dos animais tratados com Angiotensina-(1-7) e doxorubicina;
- ❖ Investigar o efeito da Angiotensina-(1-7) na prevenção da toxicidade aguda ou subaguda induzida pela doxorubicina;
- ❖ Analisar o efeito da Angiotensina-(1-7) na reversão da toxicidade induzida pela doxorubicina;
- ❖ Esclarecer a repercussão da Angiotensina-(1-7) e doxorubicina na massa corporal e dos órgãos dos animais;
- ❖ Estabelecer, se possível, protocolo de tratamento associado de doxorubicina e Angiotensina-(1-7).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Para experimentação deste trabalho foram utilizados 35 ratos adultos Wistar (*Rattus norvegicus*), pesando de 160-278g, provenientes do Biotério Prof. Thomas George da Universidade Federal da Paraíba, mantidos sob condições controladas de temperatura e ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à água e alimentação. O uso dos ratos foi devidamente autorizado pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da UFPB, por meio de aprovação do projeto com número de certidão CEUA 0204/13.

3.2. Grupos experimentais e tratamento dos animais

Os animais passaram por um ciclo de seis semanas de experimentação e foram divididos em seis grupos: Controle solução salina, Controle angiotensina-(1-7), Controle doxorrubicina, Preventivo 1, Preventivo 2 e grupo Tratamento. Cada grupo recebeu um diferente tipo de tratamento, todos eles realizados com a administração intraperitoneal (IP), sendo utilizadas a Solução salina (NaCl 0,9%), a Angiotensina-(1-7) sintética (Millipore) e a Doxorrubicina (Doxo) (Cloridrato de doxorrubicina – 50 mg – Glenmark), conforme figura abaixo:

Figura 1. Delineamento experimental.



Figura 1. A administração de solução salina e Ang-(1-7) eram realizadas diariamente, com regularidade no horário de aplicação, no caso da doxorrubicina os animais recebiam a aplicação com a substância apenas no primeiro dia da semana. Quantidade de animais por grupo: Controle solução

salina (5 animais), Controle angiotensina-(1-7) (5 animais), Controle doxorubicina (7 animais), Preventivo 1 (5 animais), Preventivo 2 (5 animais) e grupo Tratamento (8 animais).

Fonte: O autor (2018).

As substâncias foram administradas via intraperitoneal. A angiotensina-(1-7) na dose de 30µg/kg (DIAS-PEIXOTO e col., 2008) sendo diluída em NaCl 0,9%, e a doxorubicina sem diluição na dose de 5mg/kg (OLIVEIRA e col., 2014; HRENAK e col., 2013; OLIVEIRA e col., 2013).

3.2.1. Registro da massa corporal dos animais

O registro da massa corporal dos animais era realizado diariamente em balança analítica com precisão de 0,01g, ao longo de todo o período de experimentação. O registro era feito tanto para cálculo da dosagem das moléculas usadas, como para acompanhamento do ganho de massa corporal dos animais.

3.3. Ecocardiografia: Avaliação da função ventricular

Para as análises ecocardiográficas, os animais foram pesados e em seguida levados para o Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular da UFPB. Antes do exame, os animais recebiam via intraperitoneal os anestésicos: cloridrato de cetamina (50 mg/kg) e cloridrato de xilidino (1 mg/kg). Em seguida era realizada a tricotomia da porção esquerda do tórax dos ratos. Os animais, em seguida, passaram pela avaliação Ecocardiográfica (Figura 2), onde foram avaliadas, nos modos mono (M) e bidimensional (bi), as variáveis: diâmetro diastólico, diâmetro sistólico, septo interventricular, parede posterior do ventrículo esquerdo e fração de ejeção. Para realização do exame, os animais foram posicionados em decúbito dorsal e foi utilizado o equipamento modelo SonoSite M-Turbo. Para avaliar as medidas estruturais do coração foram obtidas imagens em modo monodimensional (modo-M) orientado pelas imagens em modo bidimensional, estando o transdutor em posição para-esternal eixo menor. A avaliação do ventrículo esquerdo (VE) foi realizada posicionando o cursor do modo-M logo abaixo do plano da valva mitral no nível dos músculos papilares (Simone e col., 1992; Plana e col., 2014). A função sistólica do VE foi avaliada pela porcentagem de encurtamento sistólico ((diâmetro diastólico – diâmetro sistólico) / diâmetro diastólico). No total foram realizados três Ecocardiogramas, em diferentes momentos do experimento, sendo o primeiro realizado pré-experimentação, o segundo durante a semana 3, e o último na última semana do tratamento.

Figura 2. Ecocardiografia – Análise em modo Monodimensional.

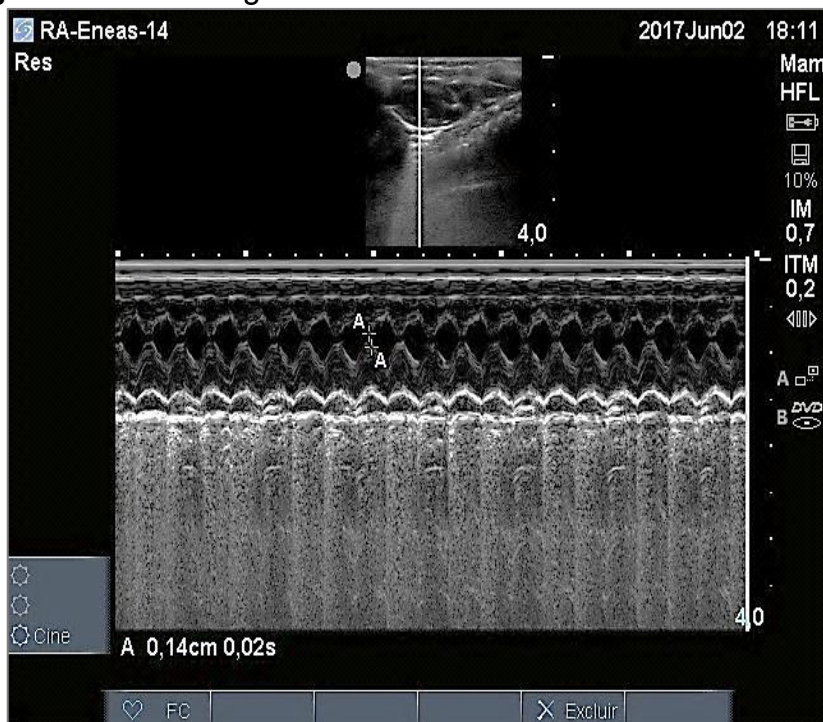


Figura 2. Representação de imagem gerada pelo Ecocardiograma na obtenção de medidas de Parede Posterior do Ventrículo Esquerdo, pela análise monodimensional.

Fonte: O autor (2017).

3.4. Necropsia

3.4.1. Análise morfológica macroscópica

Após as seis semanas de tratamento dos animais, os animais passaram por um processo de análise morfológica macroscópica por meio da necropsia. Os ratos foram pesados e em seguida eutanasiados por decapitação em guilhotina. Posteriormente foram utilizados os instrumentais cirúrgicos (pinça dente de rato, pinça dissecação, pinça clínica e tesoura cirúrgica) para dissecação e avaliação das características presentes no organismo dos animais.

3.4.2. Avaliação da massa dos órgãos

Outro procedimento da necropsia foi a retirada dos órgãos – coração, pulmão, rins (direito - D e esquerdo - E), baço e fígado – os órgãos foram pesados individualmente, para avaliação da massa, e colocados em placas de Petri com solução salina para o registro fotográfico. Os dados obtidos foram transcritos com o valor bruto da massa de cada órgão, como também foi realizada a relação da massa do órgão com a massa corporal do animal.

3.5. *Análise de dados*

Os dados encontrados foram analisados através da média $\pm$ desvio padrão, já que não foi possível realizar análise estatística devido ao número elevado de morte dos animais. Também foi realizada avaliação qualitativa dos registros fotográficos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Curva de Mortalidade

Ao longo do experimento foi observada uma característica importante: o índice de mortalidade dos animais. Dos 35 ratos que iniciaram na experimentação apenas 19 permaneceram vivos até o último dia de avaliação. Dos 19 animais vivos, apenas 4 dos grupos de tratamento com a associação de Ang-(1-7) e Doxorubicina fazem parte desse número, conforme tabela 1:

Tabela 1. Número de animais pré e pós-experimentação.

Grupos	Quantidade de animais no experimento	
	Início	Final
Controle Solução salina	5	5
Controle Ang-(1-7)	5	5
Controle Doxorubicina	7	5
Preventivo 1	5	1
Preventivo 2	5	1
Tratamento	8	2

Fonte: O autor (2018).

Verificou-se também que apenas no caso dos grupos Controle Solução salina e Controle Ang-(1-7) a porcentagem de sobrevivência foi de 100%, como mostra o gráfico 1 da curva de mortalidade representado abaixo. Os resultados de sobrevivência e crescimento dos animais no grupo Controle Ang-(1-7) corroboram os achados de WAGENAAR e col. (2013), que confirmaram não haver alteração nesses dois parâmetros quando injetada a Ang-(1-7) cíclica como agonista para o receptor Mas, em comparação ao grupo Controle Solução salina. Adicionalmente, nos grupos Preventivo 1, Preventivo 2 e Tratamento, o número final de animais foi inferior a 3, o que dificultou a análise dos dados, com empecilho para realização de testes estatísticos.

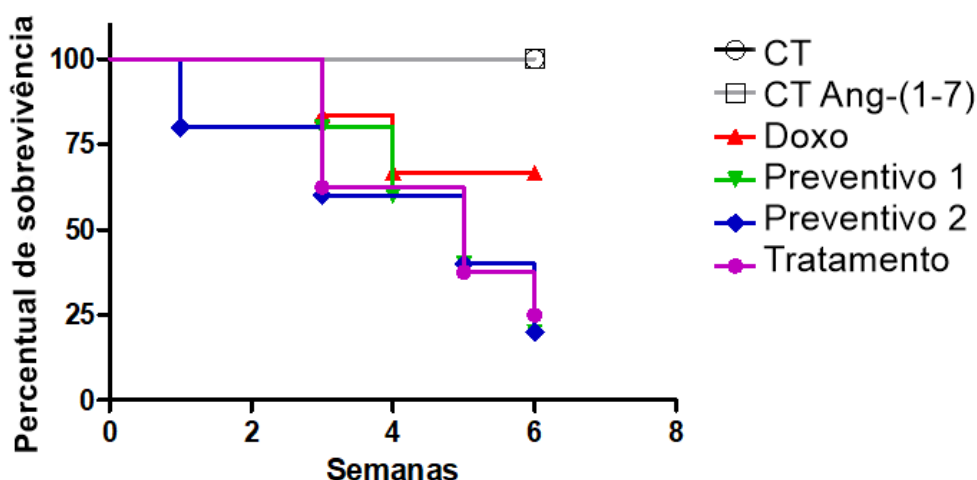
Gráfico 1. Curva de mortalidade.

Gráfico 1. Na análise do percentual de sobrevivência é possível observar que 100% dos animais dos grupos Controle salina e Controle Ang-(1-7) sobreviveram. No grupo Doxorrubicina esse representativo caiu para menos de 75%, e menos de 25% nos grupos Preventivo 1 e 2, e Tratamento.

Fonte: O autor (2018).

Esses dados confirmam que a Ang-(1-7) não promoveu efeitos deletérios no organismo dos animais quando administrada isoladamente, permanecendo com o mesmo número de animais que o Controle solução salina, o que difere do grupo Controle doxorrubicina, no qual ocorreu o óbito de aproximadamente 30% dos animais ao longo do tratamento. WANG e col. (2014) ao avaliarem um protetor da toxicidade provocada pela doxorrubicina em nível celular neuronal, observaram uma mortalidade de 100% das células tratadas com a Doxo, evidenciando o potencial destrutivo dessa droga em diversos grupos celulares. Contrastando com nossas expectativas iniciais, verificamos que em todos os grupos nos quais houve conjugação de Ang-(1-7) e doxorrubicina, a mortalidade foi algebricamente maior que no grupo doxorrubicina isolada ou grupo controle, ocorrendo mortalidade de 80% nos grupos Preventivo 1 e 2 e 75% no grupo tratamento.

4.2. Massa corporal dos animais

Quando se trata da massa corpórea também é possível observar algumas diferenças consideráveis entre alguns grupos, neste ponto os grupos de animais que foram administrados apenas com a doxorrubicina durante algumas semanas (Doxo e Tratamento), revelaram uma queda no valor da massa corporal desses animais, conforme gráfico 2. Essa característica encontrada corrobora um estudo de MELO e col. (2012), que obteve como resultado da aplicação de 5 mg/kg de doxorrubicina, além

do emagrecimento progressivo dos roedores, algumas peculiaridades sistêmicas como apatia, desidratação e fezes diarreicas com muco, sendo tal aspecto generalizado também observado nos animais que participaram do nosso estudo.

Gráfico 2. Massa corporal inicial e final dos animais.

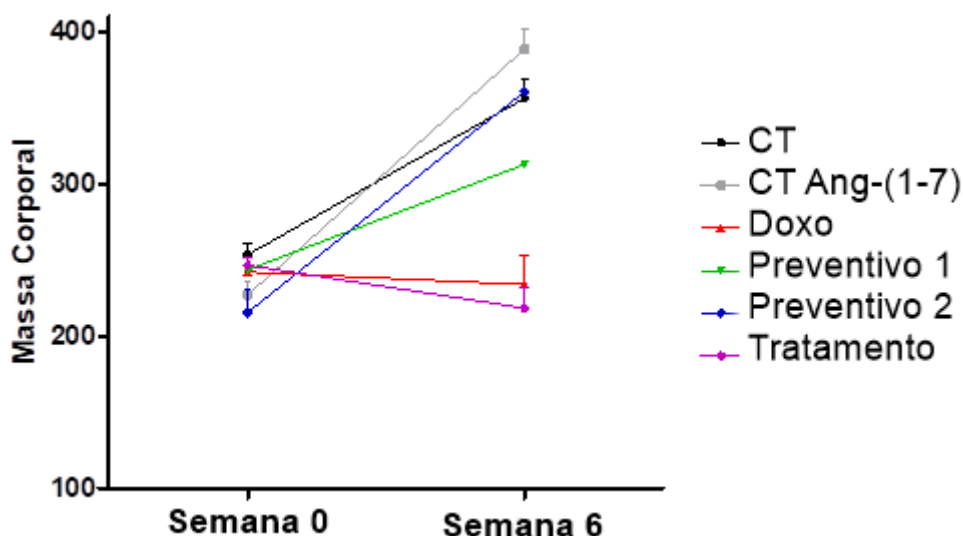


Gráfico 2. Indicado em cinza o aumento da massa dos animais do grupo Cont. Ang-(1-7); em azul o grupo Preventivo 2; em preto o grupo Cont. salina; o grupo Preventivo 1 aparece em verde; o grupo Doxo está demonstrado em vermelho e o grupo tratamento foi indicado em fúcsia. Seguindo nesta os valores algébricos finais de cada grupo.

Fonte: O autor (2018).

Em contraste temos o grupo Controle Ang-(1-7) com valores que superam até mesmo os do grupo Controle Solução salina, e ainda que seja associada com a doxorrubicina, é possível observar uma preservação no crescimento dos animais, excluindo a possibilidade dessa substância estar envolvida na morte por déficit nutricional, por exemplo.

4.3. Morfologia macroscópica orgânica

Como inicialmente não havia expectativa de morte nos grupos com uso de Ang-(1-7), a equipe do biotério não foi avisada e os animais que morreram de forma mais precoce foram descartados e nem todos passaram pela necropsia. Dos animais que puderam ser analisados, a maioria apresentou características morfológicas parecidas em alguns órgãos: no coração (Figura 3), ocorreu o acúmulo de sangue nos átrios; nos pulmões (Figura 4), ocorreu a presença de pontos amarelados e aumento do volume desses órgãos, que pode estar associado à pneumonia por *Pneumocystis carinii*, doença provocada como reação adversa à doxorrubicina (FALEIROS e col., 2017), que apresenta infiltrados de linfócitos e macrófagos, assim como, em caso mais atípico, a

presença de cavitações, lesões císticas e múltiplos nódulos nos pulmões (BARRA e col., 2000); e observamos a presença de líquido na cavidade peritoneal (Figura 5).

Figura 3. Coração com acúmulo de sangue nos átrios.

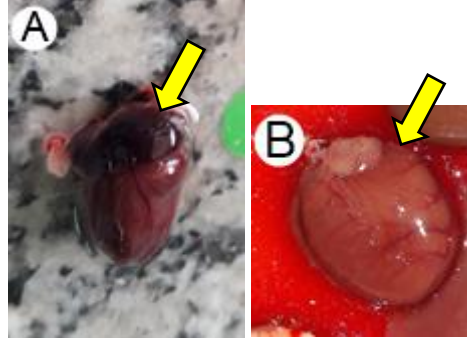


Figura 3. A) Seta evidenciando átrio direito, do coração do animal, com acúmulo de sangue. B) Seta evidenciando o comparativo de um átrio direito sem acúmulo sanguíneo.

Fonte: O autor (2018).

Figura 4. Efeito deletério nos pulmões.



Figura 4. Indicadas manchas brancas que confirmam a destruição dos pulmões do animal.

Fonte: O autor (2018).

Figura 5. Acúmulo de líquido em região peritoneal.

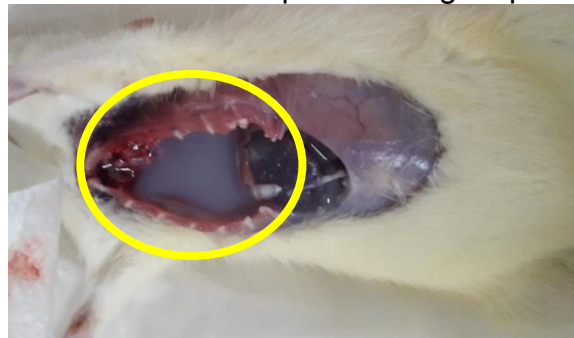


Figura 5. Marcada a região de concentração de líquido observada durante a necropsia.

Fonte: O autor (2018).

Em referência ao coração, esses achados confrontam com o que é discutido entre inúmeros pesquisadores, que consideram a proteção cardíaca como ação resolutive da Ang-(1-7) ou mesmo dos meios que induzem a sua produção, como, por exemplo, numa revisão produzida por PATEL e col. (2016), que demonstrou que o eixo

ECA2/Ang-(1-7)/rMas tem capacidade de contrarregular o eixo ECA/Ang II/rAT₁ agindo, portanto, na proteção do coração, o que não justificaria esse acúmulo sanguíneo na cavidade atrial.

Os animais que sobreviveram após as 6 semanas de tratamento foram avaliados quanto à sua morfologia macroscópica orgânica geral, e também de seus órgãos individualmente, por meio da necropsia, e essas alterações podemos verificar na Figura 6.

Figura 6. Visão geral: Morfologia macroscópica orgânica dos grupos estudados.

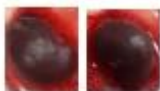
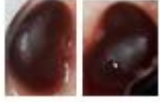
GRUPOS	Sobrev.	Coração	Pulmões	Fígado	Rins (D e E)	Baço
A Cont. salina	100%					
B Cont. Ang-(1-7)	100%					
C Cont. Doxorubicina	>75%					
D Preventivo 1	>25%					
E Preventivo 2	>25%					
F Tratamento	>25%					

Figura 6. Visão geral comparativa da Taxa de sobrevivência e morfologia dos órgãos: coração, pulmões, fígado, rins D e E e baço nos grupos: Linha A) Cont. salina; Linha B) Cont. Ang-(1-7); Linha C) Cont. doxorubicina; Linha D) Preventivo 1; Linha E) Preventivo 2 e Linha F) Tratamento.

Fonte: O autor (2018).

Constatou-se que no grupo Controle Solução salina, de forma inesperada, alguns animais apresentaram uma morfologia que indica possíveis efeitos deletérios,

como focos hemorrágicos em pulmões (em 3 animais) (Figura 7), manchas brancas em ambos os rins (em 1 animal) (Figura 8), e apenas em um dos ratos desse grupo foi capaz de se observar uma normalidade macroscópica morfológica. No entanto, é importante considerar que esses animais também contam com características próprias à sua genética, que podem influenciar ao passarem por esse período de estresse pela administração das substâncias e manuseio diário.

Figura 7. Focos hemorrágicos em pulmões.

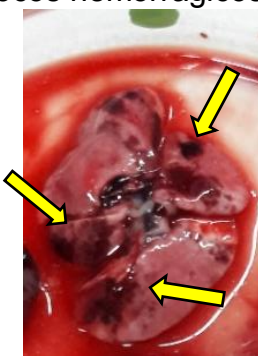


Figura 7. Manchas de sangue indicando hemorragia nos órgãos.
Fonte: O autor (2018).

Figura 8. Manchas brancas em rins D e E.



Figura 8. Manchas brancas observadas também nos rins, como evidenciado nas setas.
Fonte: O autor (2018).

Quando consideramos o grupo Controle Ang-(1-7) os resultados observados foram diferentes, já que nesse grupo os 5 animais apresentaram características macroscópicas morfológicas normais (Figura 6 – Linha B).

Em relação aos animais que receberam a doxorrubicina (Figura 6 – Linha C), os dados registrados demonstraram uma congruência principalmente sobre uma rigidez característica nos órgãos dos animais desses grupos, em especial no fígado, além do acúmulo de líquido na cavidade peritoneal. Estudos de cancerologia, como o de SANTOS (2011), evidenciam a participação da quimioterapia na formação das Espécies Reativas do Metabolismo do Oxigênio (ERMO), que apesar de ter uma função

necessária ao mecanismo de ação da droga, leva também a danos como a toxicidade pulmonar, renal e hepática, e essa característica foi claramente percebida nos grupos que receberam a doxorrubicina. Fenômenos que são associados a drogas tóxicas, como a lipoperoxidação, por exemplo, provocam alterações estruturais e de permeabilidade membranar nas células, o que pode culminar na morte celular e, por conseguinte, nos levar a ideia de consequências orgânicas deletérias (GARDÈS-ALBERT, 1991; FERREIRA, 1997), como encontrado nos resultados desse estudo. No caso do grupo Controle doxorrubicina, além dessa rigidez e acúmulo de líquido na região do peritônio, foram encontrados focos hemorrágicos extensos nos pulmões dos ratos, que podem estar ligados ao efeito adverso de crescimento da formação de células sanguíneas no tecido pulmonar (SOCIEDADE AMERICANA DO CÂNCER, 2016), e é possível observar também o crescimento das vesículas seminais e da vesícula biliar (Figura 9), que pode ser devido a alguma complicação apresentada pelo animal antes mesmo do período de tratamento, já que foi um caso único; essa morfologia descrita anteriormente também foi vista no grupo tratamento (Figura 10), com exceção do aumento das vesículas.

Figura 9. Crescimento das vesículas seminais e biliar.

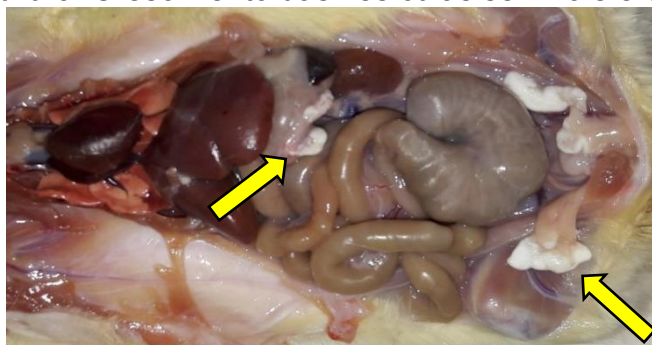
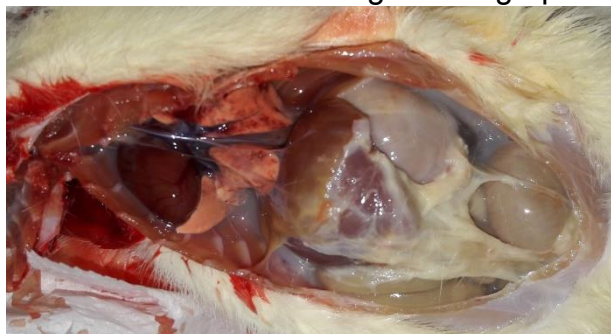


Figura 9. Vesículas seminais e biliar com fisiologia alterada (diâmetros maiores que o normal).
Fonte: O autor (2018).

Figura 10. Características morfológicas do grupo tratamento.



Fonte: O autor (2018).

Analizando os outros grupos que tiveram interação entre a Ang-(1-7) e a doxorrubicina, os animais que foram administrados com ambas as drogas, desde o início do experimento, no período de 4 semanas (Preventivo 1: Figura 6 – Linha D) apresentaram, além das características comuns aos grupos que receberam doxorrubicina, o aumento no volume pulmonar (Figura 11). Já é conhecido que existem várias doenças pulmonares induzidas pelo estresse oxidativo (que pode ser provocado pela ação de drogas tóxicas), como é o caso da displasia broncopulmonar, pneumoconiose, asma, enfisema, SARA, e etc., e como parte da fisiopatologia da doença está a hiperplasia e a hipertrofia alveolares (BOVERIS, 1986), que podem ter como resultado o aumento do volume pulmonar. E no grupo Preventivo 2 (Figura 6 – Linha E), que continuou recebendo angiotensina por mais 2 semanas, o aumento se deu no baço.

4.4. Função ventricular cardíaca

O exame ecocardiográfico contempla uma maneira avaliativa eficiente na imagiologia cardíaca, compreende uma forma não invasiva com boa versatilidade, fácil replicabilidade e uma interessante capacidade de analisar a função ventricular esquerda e suas estruturas relacionadas (DAHER e col., 2011), sendo assim foi incorporado como uma das metodologias deste estudo.

Os dados encontrados na ecocardiografia dos animais demonstraram um perfil de função ventricular cardíaca semelhante entre os grupos de tratamento, esse efeito contrapõe os resultados de ICHIKAWA (2014), os quais demonstraram que as medidas de encurtamento fracional e fração de ejeção, do grupo que recebeu a doxorrubicina, sofreram significativa deterioração comparado ao grupo controle. Quanto à estrutura, apesar da impossibilidade de análise estatística, e do problema de alguns grupos terem apenas um animal ao final do experimento, verificou-se uma redução algébrica dos valores das variáveis: diâmetro diastólico (Gráfico 3), septo interventricular (Gráfico 4) e parede posterior do ventrículo esquerdo (Gráfico 5) no final do experimento, quando comparado ao grupo Controle.

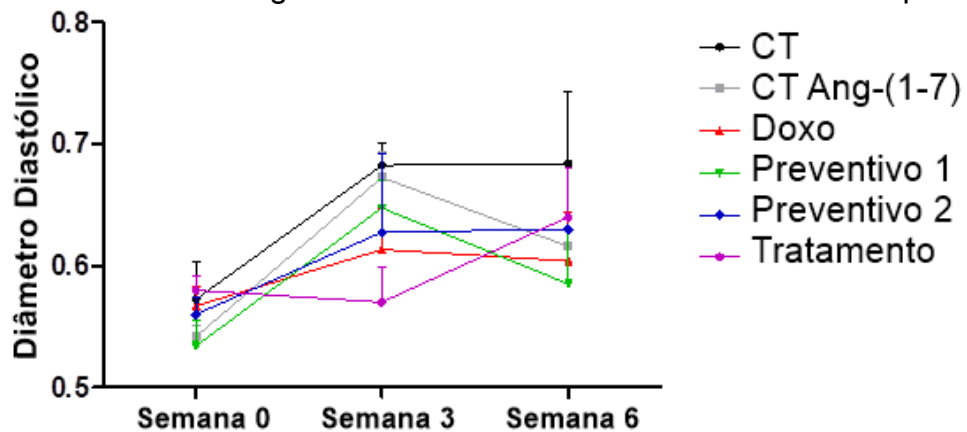
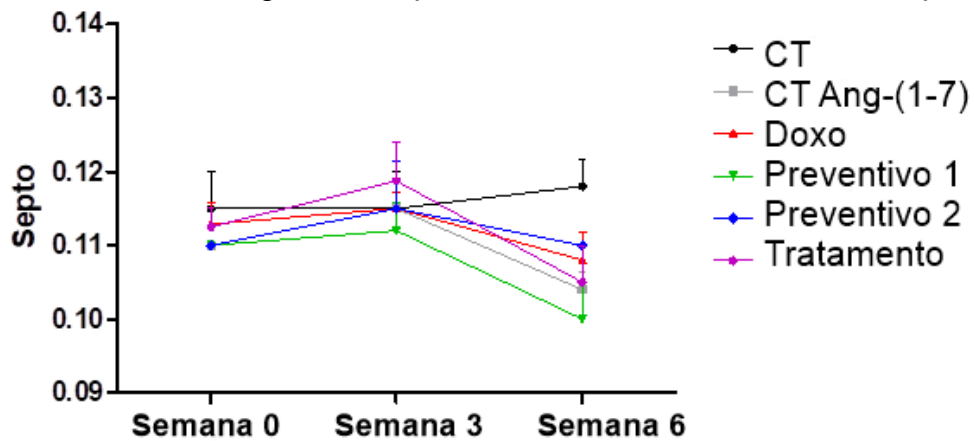
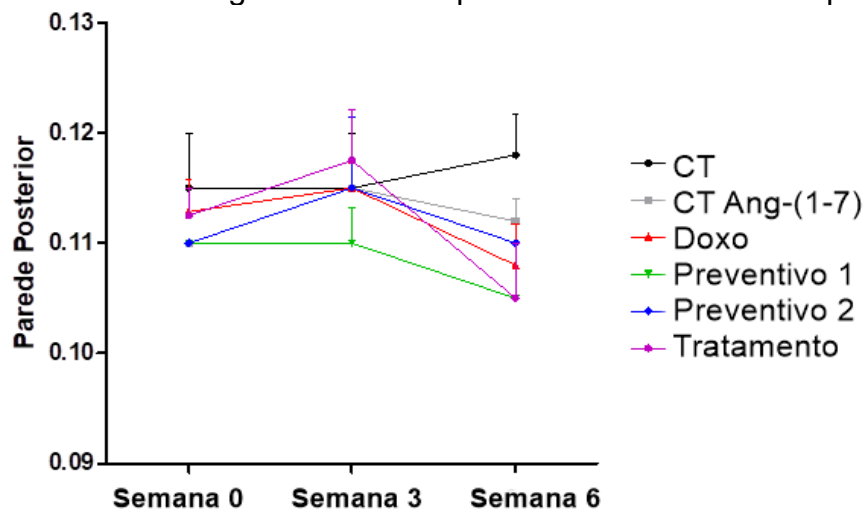
Gráfico 3. Ecocardiografia – Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo.

Gráfico 3. Os pontos marcam as avaliações de cada semana, sendo a semana 0 representando a pré-experimentação.

Fonte: O autor (2018).

Gráfico 4. Ecocardiografia – Septo interventricular do ventrículo esquerdo.

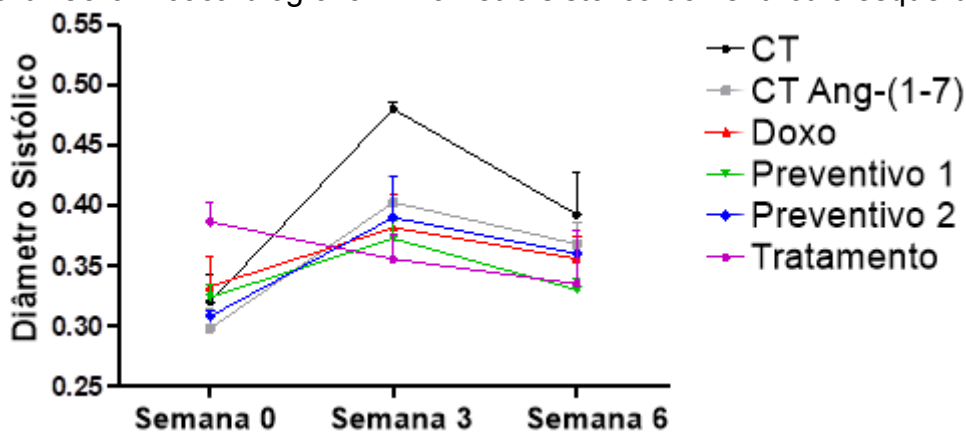
Fonte: O autor (2018).

Gráfico 5. Ecocardiografia – Parede posterior do ventrículo esquerdo.

Fonte: O autor (2018).

No caso do diâmetro sistólico (Gráfico 6) esses valores se aproximaram até mesmo do grupo Controle Solução salina, deixando todos os grupos com a mesma expressão de sístole ventricular esquerda. Essa representação mostra que não houve alteração no diâmetro sistólico dos animais, independente do grupo de tratamento ao qual fizessem parte, nesse período de 6 semanas de experimento, concordando com um estudo realizado recentemente por OLIVEIRA e col. (2017), que avaliou especificamente a função sistólica do ventrículo esquerdo de ratos expostos à doxorubicina, e também não encontrou diferença em relação ao grupo controle. O resultado apresentado nessa variável, pode ser explicado também pelo tempo de tratamento, já que é possível que as disfunções cardíacas tenham seu potencial revelado em períodos de longo prazo (FELKER e col., 2000) e são relacionadas ao efeito cumulativo da droga (EWER e LIPPMAN, 2005).

Gráfico 6. Ecocardiografia – Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo.

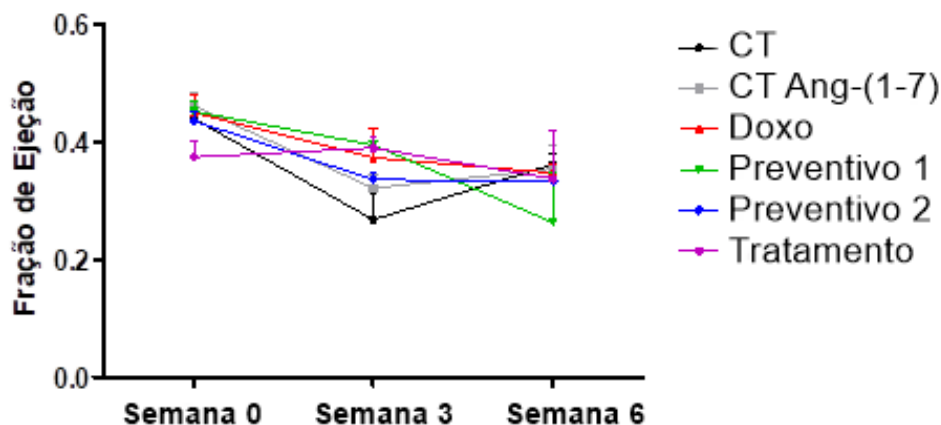


Fonte: O autor (2018).

Quando se trata da fração de ejeção (Gráfico 7), verificamos que todos os grupos têm comportamento similar, corroborando achado de MELO e col. (2012), apenas observada uma tendência a diminuição no grupo Preventivo 1 na última medida. Nesse aspecto vale considerar alguns estudos como o de PLANA e col. (2014), onde esses autores explicam que o coração possui uma reserva cardíaca importante, que pode ser capaz de suportar um determinado nível de sobrecarga, fazendo com que os indicadores diastólicos e sistólicos, que influenciam na variável fração de ejeção, não sofram alterações até que essa sobrecarga aconteça de forma excessiva. Sendo assim, esses dados indicam que no nosso protocolo experimental não foi possível

observar uma disfunção ventricular induzida pela doxorrubicina, e que a combinação com Ang-(1-7) não alterou os parâmetros observados.

Gráfico 7. Ecocardiografia – Fração de ejeção do ventrículo esquerdo.



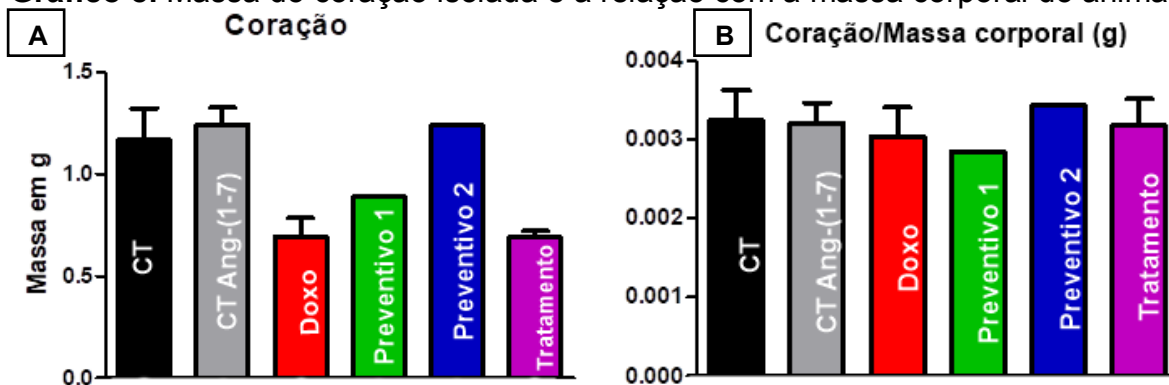
Fonte: O autor (2018).

4.5. Massa dos órgãos necropsiados

Com a realização da necropsia, além da morfologia geral do animal, conseguimos avaliar a massa de alguns órgãos como o coração, os pulmões, o baço, os rins direito e esquerdo e o fígado. Em todos esses órgãos analisados o grupo Controle Ang-(1-7) se comportou igual ao grupo Controle Solução salina, comprovando que a Ang-(1-7), quando administrada de forma isolada, não promove alterações macroscópicas nos órgãos.

Quando observada isoladamente a massa do coração (Gráfico 8 - A), houve uma redução nos grupos Controle doxorrubicina, Preventivo 1 e Tratamento.

Gráfico 8. Massa do coração isolada e a relação com a massa corporal do animal.



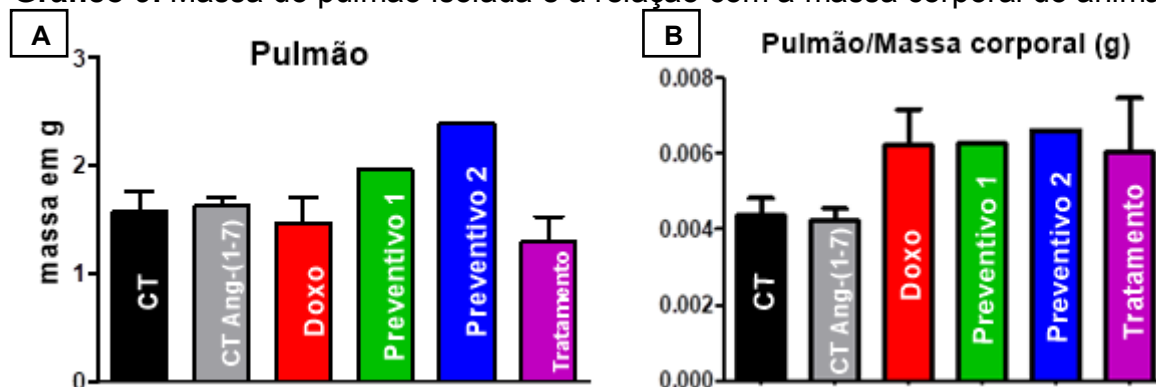
Fonte: O autor (2018).

Contudo, quando é feita a relação massa do coração pela massa corporal (Gráfico 8 - B), verificamos que a proporção não foi alterada entre os grupos, indicando

que as alterações observadas devem estar relacionadas ao ganho de peso dos animais.

A massa pulmonar isolada (Gráfico 9 - A), mostrou-se alterada nos grupos Preventivo 1 e Preventivo 2 quando avaliado apenas o órgão dos animais, mas na relação massa do órgão/massa corporal do animal (Gráfico 9 - B), esse aumento no volume pulmonar também pode ser observado nos grupos Controle doxorrubicina e Tratamento, confirmando os resultados já constatados provenientes da avaliação morfológica macroscópica dos órgãos, de que a doxorrubicina pode estar envolvida na toxicidade pulmonar e a Ang-(1-7) não foi capaz de reverter.

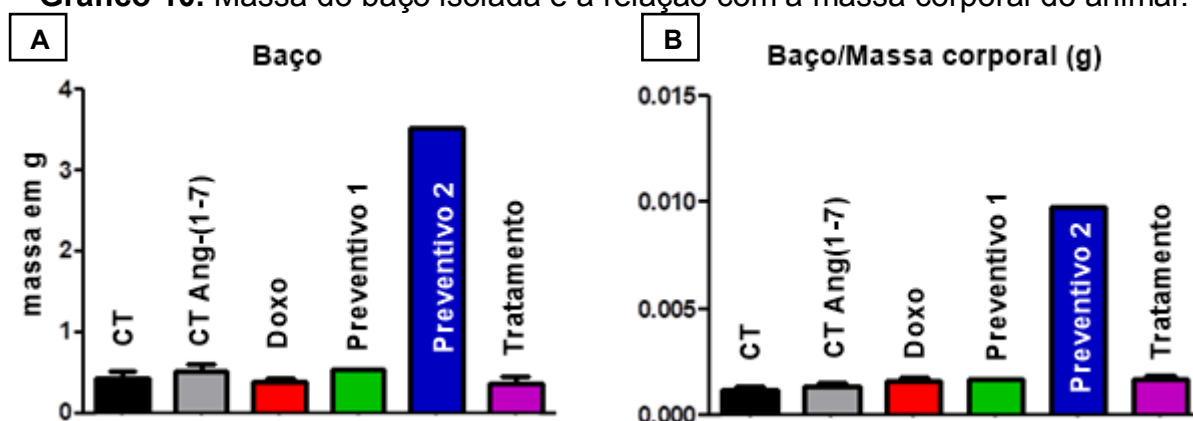
Gráfico 9. Massa do pulmão isolada e a relação com a massa corporal do animal.



Fonte: O autor (2018).

Os dados que obtivemos relativos a massa do baço (Gráfico 10 - A) e sua relação com a massa corporal do animal (Gráfico 10 - B) evidenciaram uma diferença importante no animal do grupo Preventivo 2, enquanto os demais grupos se mostraram semelhantes ao grupo Controle Solução salina, este dado confirma a característica macroscópica alterada no órgão quando analisamos os registros fotográficos do animal. Em observação a esse resultado, podemos fazer uma consideração importante, já que o baço é um órgão relevante no que compete a filtragem de patógenos e antígenos, além de ser um órgão chave no metabolismo do ferro (BRONTE e PITTET, 2013), e como mencionado anteriormente neste estudo, a doxorrubicina, quando acumulada nas mitocôndrias, aumenta os níveis de ferro nessa organela, o que pode ter levado à uma sobrecarga desse órgão no caso desse animal.

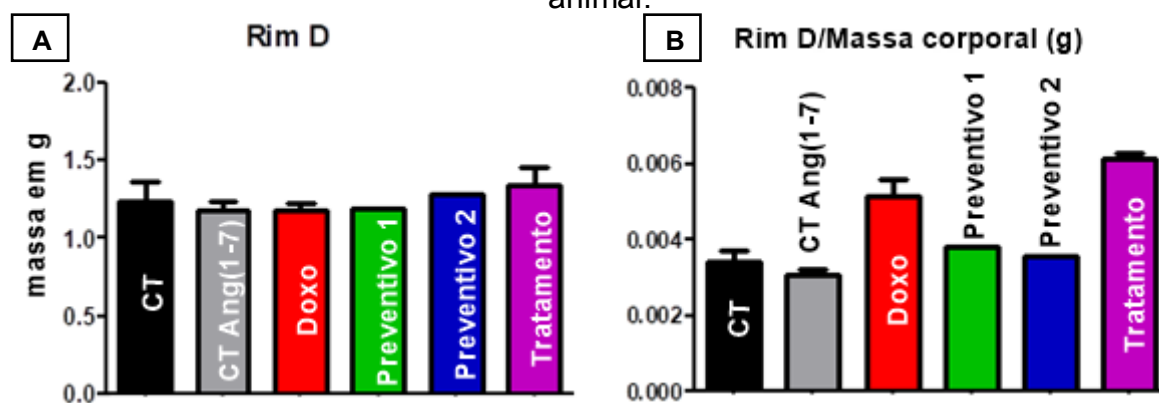
Gráfico 10. Massa do baço isolada e a relação com a massa corporal do animal.



Fonte: O autor (2018).

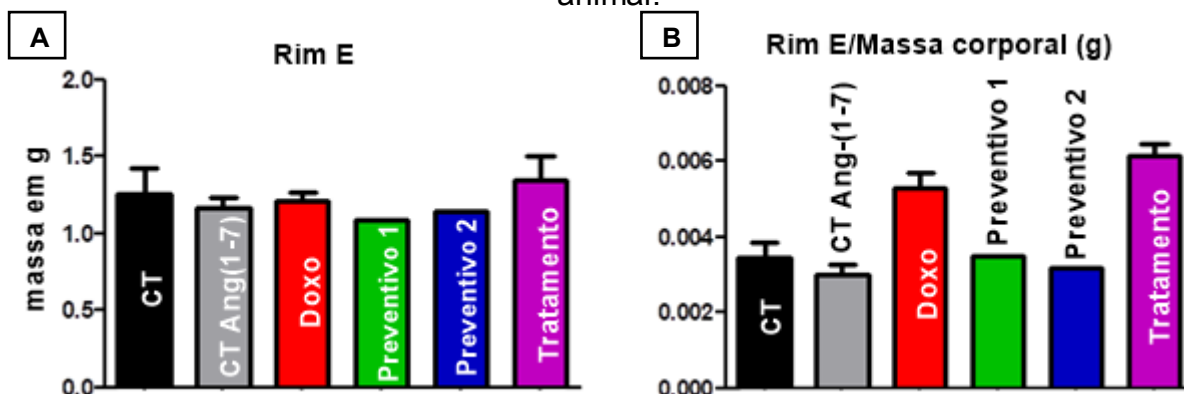
No que se refere aos rins direito e esquerdo, quando analisado apenas a massa dos órgãos (Gráficos 11 - A e 12 - A) não encontramos diferença entre os grupos de tratamento, todos apresentavam características semelhantes ao grupo Controle Solução salina, mas constatamos que se observado a massa do órgão em relação à massa corporal do animal (Gráficos 11 - B e 12 - B) houve aumento da relação da massa dos rins nos grupos que receberam apenas a doxorrubicina no início do experimento (Controle doxorrubicina e Tratamento), o que não aconteceu nos grupos em que os animais foram administrados com a Ang-(1-7) desde o início, mostrando uma possível atuação da Ang-(1-7) na prevenção de efeitos tóxicos nos rins dos animais. Esse achado corrobora um estudo de SIMÕES-E-SILVA e col. (1997), que esclarece o envolvimento dos efeitos biológicos da Ang-(1-7), quando mediados por receptores específicos, nas importantes ações centrais e periféricas do Sistema renina-angiotensina, portanto com repercussão direta na fisiologia renal.

Gráfico 11. Massa do rim direito isolada e a relação com a massa corporal do animal.



Fonte: O autor (2018).

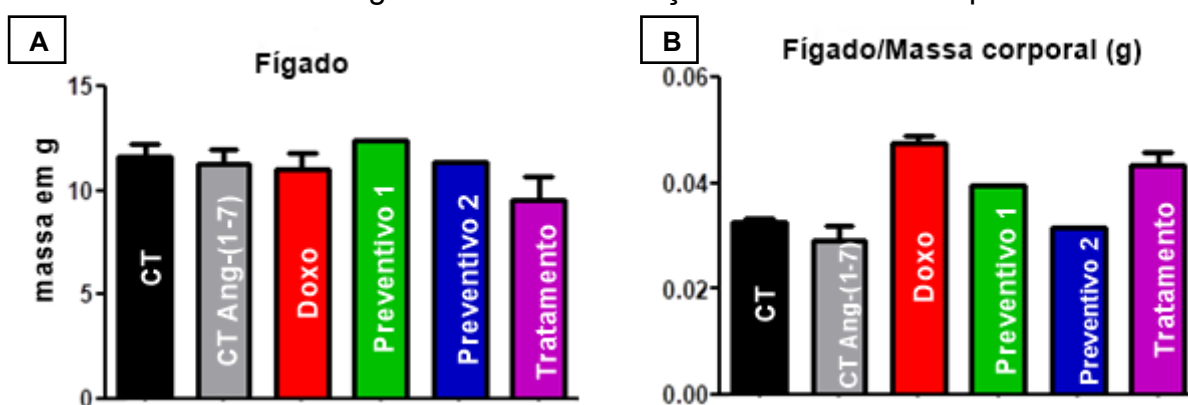
Gráfico 12. Massa do rim esquerdo isolada e a relação com a massa corporal do animal.



Fonte: O autor (2018).

A massa do fígado dos animais também não apresentou diferença entre os grupos quando observado isoladamente (Gráfico 13 - A), mas quando considerado a massa corporal do animal (Gráfico 13 - B) os grupos Controle doxorrubicina, Preventivo 1 e Tratamento manifestaram uma diferença importante do grupo Controle Solução salina, sendo essa diferença maior nos grupos que receberam apenas a doxorrubicina no começo do experimento. Nesta perspectiva, é válido lembrar que o fígado tem considerável participação no metabolismo dos xenobióticos (compostos químicos, onde estão incluídos os fármacos, com efeitos adversos ao organismo humano) através de suas enzimas hepáticas (REMMER, 1970; ALMAZROO, 2017), sendo assim, é um alvo considerável para os efeitos tóxicos provocados pela doxorrubicina. Com essa informação é possível considerar que a Ang-(1-7) pode proteger (como constatado em rins e fígado) ou reforçar (visto principalmente nos pulmões) o efeito tóxico provocado pela doxorrubicina.

Gráfico 13. Massa do fígado isolada e a relação com a massa corporal do animal.



Fonte: O autor (2018).

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados do presente estudo, podemos concluir que a doxorrubicina não induziu disfunção cardíaca nesse período de tratamento, promoveu perda de massa corporal dos animais, alterou a relação peso do órgão/peso do corpo de alguns órgãos e alterou macroscopicamente aspectos da morfologia dos órgãos dos animais.

Adicionalmente, considerando que não foi estabelecida uma disfunção cardíaca, não foi possível analisar prevenção de cardiotoxicidade pela Ang-(1-7). Apesar disso, verificamos que a Ang-(1-7) promoveu aumento da mortalidade nos grupos tratados com doxorrubicina, não sendo possível, portanto, estabelecer protocolo de tratamento associado de doxorrubicina e Angiotensina-(1-7), observamos também que há indícios de sua participação na preservação do peso de ambos os rins, o que pode alavancar uma certa participação na prevenção da toxicidade aguda e subaguda, mas não podemos considerar que tenha havido reversão da mesma. Verificamos também que a Ang-(1-7) previne a perda de massa corporal induzida pela doxorrubicina e que não provocou diferenças nos parâmetros de avaliação ventricular observados no ecocardiograma.

REFERÊNCIAS

1. ABBAS, A.; GORELIK, G.; CARBINI, L. A.; SCICLI, A. G. Angiotensin-(1-7) induces bradykinin-mediated hypotensive responses in anesthetized rats. **Hypertension**. v. 30, 1997.
2. ALMAZROO, O. A., MIAH, M. K., VENKATARAMANAN, R. Drug Metabolism in the Liver. **Clinics in Liver Disease**. v. 21, n. 1, 1–20, 2017.
3. AMERICAN CANCER SOCIETY. Chemotherapy for breast cancer. 2017. Disponível em: https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/chemotherapy-for-breast-cancer.html#written_by
4. BARRA, L. A. C. et al. Pneumonia por "Pneumocystis carinii": forma tumoral. **J. Pneumologia**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 149-152, Jun 2000.
5. BENTER, I. F.; FERRARIO, C. M.; MORRIS, M.; DIZ, D. I. Antihypertensive actions of angiotensin-(17) in spontaneously hypertensive rats. **Am J Physiol**. v. 269, 1995.
6. BERSELL, K.; ARAB, S.; HARING, B.; KUHN, B. Neuregulin1/ErbB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury. **Cell**. v. 138, n. 2, p. 257-70, 2009.
7. BOVERIS, A.; CADENAS, E.; REITER, R.; CHANCE, B.; JAMIESON, D. The relation of free radical production to hyperoxia. **Annu Rev Physiol**. v. 48, p. 703-19, 1986.
8. BRITO, R. R.; SANTOS, R. A. S.; FAGUNDES-MOURA, C. R.; KHOSLA, M. C.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. Role of Angiotensin-(1-7) in the Modulation of the Baroreflex in Renovascular Hypertensive Rats. **Hypertension**. v. 30, 1997.
9. BRONTE, V., PITTET, M. J. The spleen in local and systemic regulation of immunity. **Immunity**. v. 39, n. 5, p. 806-18, 2013.
10. BROSNIHAN, K. B.; LI, P.; FERRARIO, C. M. Angiotensin-(1–7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. **Hypertension**. v. 27, 1996.
11. CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; HERINGER, S. B.; BATISTA, E. N.; KHOSLA, M. C.; SANTOS, R. A. Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides. **Am J Physiol**. v. 263, 1992.
12. CARDINALE, D.; et al. Early detection of anthracycline cardiotoxicity and improvement with heart failure therapy. **Circulation**. v. 131, p. 1981–1988, 2015.

13. CORREMANS, R.; ADÃO, R.; DE KEULENAER, G. W.; LEITE-MOREIRA, A. F.; BRÁS-SILVA, C. Update on pathophysiology and preventive strategies of anthracycline-induced cardiotoxicity. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. P. 1-12, 2018.
14. COUTO, A. S.; BALTATU, O.; SANTOS, R. A. S.; GANTEN, D.; BADER, M.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J. Differential effects of angiotensin II and angiotensin-(1-7) at the nucleus tractus solitarii of transgenic rats with low brain angiotensinogen. **Journal of Hypertension**. v. 20, n. 5, 2002.
15. CRACKOWER, M. A.; SARAO, R.; OUDIT, G. Y.; YAGIL, C.; KOZIERADZKI, I.; SCANGA, S. E. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. **Nature**. v. 417, 2002.
16. CRUZ, M.; DUARTE-RODRIGUES, J.; CAMPELO, M. Cardiotoxicity in anthracycline therapy: prevention strategies. **Rev Port Cardiol**. v. 35, n. 6, p. 359–371, 2016.
17. DAHER, I. N.; KIM, C.; SALEH, R. R.; PLANA, J. C.; YUSUF, S. W.; BANCHS, J. Prevalence of abnormal echocardiographic findings in cancer patients: a retrospective evaluation of echocardiography for identifying cardiac abnormalities in cancer patients. **Echocardiography**. v. 28, p.1061-7, 2011.
18. DE SIMONE, G.; DANIELS, S. R.; DEVEREUX, R. B. et al. Left ventricular mass and body size in normotensive children and adults; assessment of allometric relations and impact of overweight. **J Am Coll Cardiol** v. 20, 1251-60, 1992.
19. DE SIMONE, G.; GANAU, A.; VERDECCHIA, P.; et al. Echocardiography in arterial hipertensión: when, why and how? **Journal of Hypertension**.v. 12, p. 1129-36, 1994.
20. DIAS-PEIXOTO, M. F.; et al. Molecular mechanisms involved in the angiotensin-(1-7)/Mas signaling pathway in cardiomyocytes. **Hypertension**. v. 52, p. 542–548, 2008.
21. DOSTAL, D. E.; KENNETH, M. B. The Cardiac Renin-Angiotensin System Conceptual, or a Regulator of Cardiac Function? **Circ. Res**. v. 85, 1999.
22. ENGEL, F. B.; SCHEBESTA, M.; DUONG, M. T.; LU, G.; REN, S.; MADWED, J. B.; et al. p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. **Genes & development**. v. 19, n. 10, p. 1175-87, 2005.
23. EWER, M. S.; LIPPMAN, S. M. Type II chemotherapy-related cardiac dysfunction: time to recognize a new entity. **J Clin Oncol**.v. 23, p. 2900-2, 2005.
24. FELKER, G. M.; et al. Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. **N Engl J Med**. v. 342, p. 1077-84, 2000.

25. FERNANDES, L.; FORTES, Z. B.; CASARINI, D. E.; NIGRO, D.; TOSTES, R. C.; SANTOS, R. A.; DE CARVALHO, M. H. Role of PGI₂ and effects of ACE inhibition on the bradykinin potentiation by angiotensin-(1-7) in resistance vessels of SHR. **Regul Pept.** v. 15, 2005.
26. FERRARIO, C. M.; CHAPPELL, M. C.; TALLANT, E. A.; BROSNIHAN, K. B.; DIZ, D. I. Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). **Hypertension.** v. 30, 1997.
27. FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-68, Mar. 1997.
28. FRAGA-SILVA, R. A.; PINHEIRO, S. V.; GONÇALVES, A. C.; ALENINA, N.; BADER, M.; SANTOS, R. A. The antithrombotic effect of angiotensin-(1-7) involves mas-mediated NO release from platelets. **Mol Med.** v.14, n. 1-2, p. 28-35, 2008.
29. FRIEDMAN, M. A.; BOZDECH, M. J.; BILLINGHAM, M. E.; RIDER, A. K. Doxorubicin cardiotoxicity. Serial endomyocardial biopsies and systolic time intervals. **JAMA.** v. 240, p. 1603-6, 1978.
30. FULVIA D. M.; et al. An Oral Formulation of Angiotensin-(1-7) Produces Cardioprotective Effects in Infarcted and Isoproterenol-Treated Rats. **Hypertension.** v. 57, p. 477-483, 2011.
31. GALLAGHER, P. E.; FERRARIO, C. M.; TALLANT, E. A. Regulation of ACE2 in cardiac myocytes and fibroblasts. **American journal of physiology Heart and circulatory physiology.** v. 295, n. 6, p. H2373-9, 2008.
32. GARDÈS-ALBERT, M.; JORE, D.; FERRADINI, C. Membrane lipid peroxidation: pulse and -radiolysis in oxyradical research. *In* Vigo-Pelfrey C. **Membrane lipid oxidation.** Santa Clara, p. 2-30, 1991.
33. GHEBEH, H.; LEHE, C.; BARHOUSH, E.; et al. Doxorubicin downregulates cell surface B7-H1 expression and upregulates its nuclear expression in breast cancer cells: role of B7-H1 as an anti-apoptotic molecule. **Breast Cancer Res.** v. 12, n. 4, p. R48, 2010.
34. GIANI, J. F.; GIRONACCI, M. M.; MUNOZ, M. C.; PENA, C.; TURYN, D.; DOMINICI, F. P. Angiotensin-(1-7) stimulates the phosphorylation of JAK2, IRS-1 and Akt in rat heart in vivo: role of the AT1 and Mas receptors. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2007.
35. GOMES, E. R.; LARA, A. A.; ALMEIDA, P. W.; GUIMARAES, D.; RESENDE, R. R.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.; et al. Angiotensin-(1-7) prevents cardiomyocyte pathological remodeling through a nitric oxide/guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent pathway. **Hypertension.** v. 55, n. 1, p. 153-60, 2010.

36. GROBE, J. L.; MECCA, A. P.; MAO, H.; KATOVICH, M. J. Chronic angiotensin-(1-7) prevents cardiac fibrosis in the DOCA-salt model of hypertension. **Am J Physiol**. 2006.
37. HEITSCH, H.; BROVKOVYCH, S.; MALINSKI, T.; WIEMER, G. Angiotensin-(1-7)-Stimulated Nitric Oxide and Superoxide Release From Endothelial Cells. **Hypertension**. v. 37, n. 1, 2001.
38. HRENAK, J.; et al. Protective effect of captopril, olmesartan, melatonin and compound 21 on doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats. **Physiological research**, v. 62, p. S181, 2013.
39. ICHIKAWA, Y.; GHANEFAR, M.; BAYEVA, M.; et al. Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation. **J Clin Invest**. v. 124, p. 617-630, 2014.
40. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Estimativa 2018 – Incidência de câncer no Brasil [acesso em agosto de 2018]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/introducao.asp>.
41. JESSUP, J. A.; TRASK, A. J.; CHAPPELL, M. C.; NAGATA, S.; KATO, J.; KITAMURA, K.; FERRARIO, C. M. Localization of the novel angiotensin peptide, angiotensin-(1-12), in the heart and kidney of hypertensive and normotensive rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. v. 294, n. 6, 2008.
42. KOSTENIS, E.; et al. G-Protein-Coupled Receptor Mas Is a Physiological Antagonist of the Angiotensin II Type 1 Receptor. **Circulation**. v. 111, 2005.
43. KUHN, B.; et al. Periostin induces proliferation of differentiated cardiomyocytes and promotes cardiac repair. **Nature medicine**. v. 13, n. 8, p. 962-9, 2007.
44. LAMBERTENGHI-DELILIERIS, G.; ZANON, P. L.; POZZOLI, E. F.; BELLINI, O. Myocardial injury induced by a single dose of adriamycin: an electron microscopic study. **Tumori**. v. 62, n. 5, p. 517-28, 1976.
45. LEFRAK, E. A.; PITHA, J.; ROSENHEIM, S.; GOTTLIEB, J. A. A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. **Cancer**. v. 32, p. 302-314, 1973.
46. LIPSHULTZ, S. E.; et al. Impaired mitochondrial function is abrogated by dexrazoxane in doxorubicin-treated childhood acute lymphoblastic leukemia survivors. **Cancer**. v. 122, p. 946-953, 2016.
47. MACHADO, R. D.; SANTOS, R. A.; ANDRADE, S. P. Opposing actions of angiotensins on angiogenesis. **Life Sci**. v. 66, n. 1, 2000.

48. MATSUBARA, L. S.; FERREIRA, A. L. Cardiomiopatia tóxicas. In: Nobre F, Serrano Jr CV, editors. **Tratado de cardiologia SOCESP**. Barueri: Manole, p. 845-57, 2005.
49. MCCLENDON, A. K.; OSHEROFF, N. DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. **Mutation research**, v. 623, n. 1-2, p. 83-97, 2007.
50. MCDEVITT, T. C.; LAFLAMME, M. A.; MURRY, C. E. Proliferation of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells is mediated via the IGF/PI 3-kinase/Akt signaling pathway. **Journal of molecular and cellular cardiology**. v. 39, n. 6, p. 865-73, 2005.
51. MEHTA, P. K.; GRIENDLING, K. K. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. **Am j Physiol Cell Physiol**. v. 292, 2006.
52. MELO, I. M.; OLIVEIRA, M. S.; MELO, M. M. Avaliação das alterações cardiotoxícas decorrentes do uso da doxorubicina: estudo experimental em ratos. **Rev Med Minas Gerais**. v. 22, n. 8, p. 1-48, 2012.
53. MENNA, P.; SALVATORELLI, E. Primary Prevention Strategies for Anthracycline Cardiotoxicity: A Brief Overview. **Chemotherapy**. v. 62, p. 159-168, 2017.
54. OLIVEIRA, L. F. L.; et al. Comparison between Radionuclide Ventriculography and Echocardiography for Quantification of Left Ventricular Systolic Function in Rats Exposed to Doxorubicin. **Arq. Bras. Cardiol**. São Paulo, v. 108, n. 1, p. 12-20, Jan. 2017.
55. OLIVEIRA, M. S.; CARVALHO, J. L.; CAMPOS, A. C. D. A.; GOMES, D. A.; DE GOES, A. M.; MELO, M. M. Doxorubicin has in vivo toxicological effects on ex vivo cultured mesenchymal stem cells. **Toxicology letters**. v. 224, n. 3, p. 380-386, 2014.
56. OLIVEIRA, M. S.; MELO, M. B.; CARVALHO, J. L.; MELO, I. M.; LAVOR, M. S.; GOMES, D. A.; DE GOES, A. M.; MELO, M. M. Doxorubicin Cardiotoxicity and Cardiac Function Improvement After Stem Cell Therapy Diagnosed by Strain Echocardiography. **Journal of cancer science & therapy**. v. 5, n. 2, p. 52-57, 2013.
57. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - Organização Pan-Americana da Saúde. Brasil – Folha informativa do câncer. Atualizada em setembro de 2018. [acesso em novembro de 2018]. Disponível em: https://www.paho.org/bra.../index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=839.
58. PASUMARTHI, K. B.; FIELD, L. J. Cardiomyocyte cell cycle regulation. **Circulation research**. v. 90, n. 10, p. 1044-54, 2002.

59. PAULA, R. D.; LIMA, C. V.; KHOSLA, M. C.; SANTOS, R. A. Angiotensin-(1-7) potentiates the hypotensive effect of bradykinin in conscious rats. **Hypertension**. v. 26, 1995.
60. PÓLIDO, D. P. G.; OLIVEIRA, L. C. P.; FALEIROS, T. G. P. Principais Reações Adversas Ocasionadas pela Quimioterapia em Pacientes com Câncer de Mama e a ação do Farmacêutico no seu Manejo. **Nativa-Revista de Ciências Sociais do Norte de Mato Grosso**, v. 6, n. 1, 2017.
61. PORSTI, I.; BARA, A. T.; BUSSE, R.; HECKER, M. Release of nitric oxide by angiotensin-(1-7) from porcine coronary endothelium: implications for a novel angiotensin receptor. **Br J Pharmacol**. v. 111, n. 3, 1994.
62. REMMER, H. The role of the liver in drug metabolism. **The American Journal of Medicine**. v. 49, n. 5, p. 617–629, 1970.
63. SANTOS, H. S.; CRUZ, W. M. S. A terapia nutricional com vitaminas antioxidantes e o tratamento quimioterápico oncológico. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 47, n. 3, p. 303-08, 2001.
64. SANTOS, R. A. S.; BRUM, J. M.; BROSNIHAN, K. B.; FERRARIO, C. M. The renin angiotensin system during acute myocardial ischemia in dogs. **Hypertension**. v. 15, 1990.
65. SANTOS, R. A. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; ANDRADE, S. P. Angiotensin-(1-7): an update. **Regul Pept**. v. 28, 2000.
66. SIMÕES-E-SILVA, A. C., BARACHO, N. C. V., PASSAGLIO, K. T., SANTOS, R. A. S. Renal actions of angiotensin-(1-7). **Braz J Med Biol Res**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 4, p. 503-513, Abril 1997.
67. SMITH, L. A.; CORNELIUS, V. R.; PLUMMER, C. J.; 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, 2010.
68. SOUZA, N. N. F.; ROSCANI, M. G.; POLEGATO, B. F.; PEREIRA, E. J.; FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S.; MATSUBARA, B. B. Avaliação Ecocardiográfica da Cardiotoxicidade Aguda Induzida pela Doxorubicina em Ratos. **Rev bras ecocardiogr imagem cardiovasc**. v. 22, n. 3, p. 20-25, 2009.
69. STEINHERZ, L. J.; STEINHERZ, P. G.; TAN, C. T. C.; HELLER, G.; MURPHY, M. L. Cardiac toxicity 4 to 20 years after completing anthracycline therapy. **JAMA**. v. 266, p. 1672-7, 1991.
70. TALLANT, E. A.; FERRARIO, C. M.; GALLAGHER, P. E. Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. v. 289, n. 4, p. H1560-6, 2005.

71. TRASK, A. J.; JESSUP, J. A.; CHAPPELL, M. C.; FERRARIO, C. M. Angiotensin-(1-12) is an alternate substrate for angiotensin peptide production in the heart. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. v. 294, n. 5, 2008.
72. VAIBHAV, B. P.; JIU-CHANG ZHONG, M. B. G.; GAVIN Y. O. Role of the ACE2/Angiotensin 1–7 Axis of the Renin–Angiotensin System in Heart Failure. **Circulation Research**.;118:1313–1326, 2016.
73. VARAGIC, J.; TRASK, A. J.; JESSUP, J. A.; CHAPPELL, M. C.; FERRARIO, C. M. New angiotensins. **J Mol Med**. 2008.
74. VILLANI, F.; COMAZZI, R.; GENITONI, V.; LACAITA, G.; GUINDANI, A.; CRIPPA, F.; et al. Preliminary evaluation of myocardial toxicity of 4'-deoxydoxorubicin: experimental and clinical results. **Drugs Exp Clin Res**. v. 11, n. 3, p. 223-31, 1985.
75. WAGENAAR, G. T., et al. Agonists of MAS oncogene and angiotensin II type 2 receptors attenuate cardiopulmonary disease in rats with neonatal hyperoxia-induced lung injury. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**. v. 305, n. 5, p. L341-51, 2013.
76. WANG, G.; et al. P7C3 neuroprotective chemicals function by activating the rate-limiting enzyme in NAD salvage. **Cell**. v. 158, n. 6, p. 1324-1334, 2014.
77. WANG, X.; TIAN, X.; WU, Y.; SHEN, X.; YANG, S.; CHEN, S. Enhanced doxorubicin production by *Streptomyces peucetius* using a combination of classical strain mutation and medium optimization. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**. p. 1-8, 2018.
78. WOJTACKI, J.; LEWICKA-NOWAK, E.; LESNIEWSKI-KMAK, K. Anthracycline-induced cardiotoxicity: clinical course, risk factors, pathogenesis, detection and prevention--review of the literature. **Med Sci Monit**. v. 6, n. 2, p. 411-20, 2000.
79. YAMAMOTO, K.; OHISHI, M.; KATSUYA, T.; ITO, N.; IKUSHIMA, M.; KAIBE, M.; et al. Deletion of angiotensin-converting enzyme 2 accelerates pressure overload-induced cardiac dysfunction by increasing local angiotensin II. **Hypertension**. v. 47, n. 4, p. 718-26, 2006.
80. ZHANG, S.; LIU, X.; BAWA-KHALFE, T.; LU, L. S.; LYU, Y. L.; LIU, L. F.; et al. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Nat Med**. v. 18, p. 1639-42. 2012.

ANEXO**Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)**



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIDÃO

João Pessoa, 28 de maio de 2013.

CEUA Nº 0204/13

Ilmo(a). **Prof. Dr. Enéas Ricardo de Moraes Gomes**

Departamento **Biotecnologia - CBiotec - UFPB**

Orientando(a) : **Enéas Ricardo de Moraes Gomes, (Outros (Justificar))**

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de **27/05/13** analisou e **APROVOU** a execução do projeto **Ações de agonistas endógeno (Angiotensina-(1-7)) e não endógeno (AVE 0991) do receptor Mas na proliferação de cardiomiócitos e regeneração cardíaca.**

Com previsão de empregar **780 Ratos WISTAR;**

- ANIMAIS

PROVÉM DO BIOTÉRIO Prof. Thomas George.

Para serem utilizados no período de **01/04/2013 a 31/03/2015**

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animal do CBiotec/UFPB



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



CERTIFICADO (2ª VIA)

Certificamos que o projeto intitulado “**Ações de agonistas endógeno (angiotensina-(1-7)) e não endógeno (AVE 0991) do receptor MAS na proliferação de cardiomiócitos e regeneração cardíaca**”, protocolo nº **0204/13** sob a responsabilidade do pesquisador Dr. **Enéas Ricardo de Moraes Gomes** – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia/UFPB em reunião de 27/05/2013.

Vigência do Projeto	2013 - 2018
Espécie/linhagem	Ratos Wistar (<i>rattus norvegicus</i>)
Número de animais	780 animais
Idade/peso	-----
Sexo	Machos
Origem	Biotério Prof. Thomas George

Profa. Dra. Islania Giselia Albuquerque Gonçalves
 Coordenadora da CEUA-UFPB