



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ANA LIZETH PADILLA PAGUADA

**Atividade anti-inflamatória e cardioprotetora do alfa-bisabolol sobre a
cardiotoxicidade induzida por doxorubicina em camundongos C57BL/6**

Fortaleza, CE
2022

ANA LIZETH PADILLA PAGUADA

Atividade anti-inflamatória e cardioprotetora do alfa-bisabolol sobre a cardiotoxicidade induzida por doxorubicina em camundongos C57BL/6.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Cesar Pereira Lima-Junior

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P16a Paguada, Ana Lizeth.
Atividade anti-inflamatória e cardioprotetora do alfa-bisabolol sobre a cardiotoxicidade induzida por doxorubicina em camundongos C57BL/6 : um estudo experimental / Ana Lizeth Paguada. – 2022.
66 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2022.
Orientação: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Junior.

1. Cardiotoxicidade. 2. PI3Kgamma. 3. TLR-9. 4. Inflamação. 5. Câncer . I. Título.

CDD 615

A Deus pela oportunidade, força
e resiliência nesses anos.

A minha família pelo apoio,
carinho e amor.

Ao LAFICA pela oportunidade,
aprendizado e vivências.

OBRIGADA!

AGRADECIMENTOS

Não existem palavras suficientes e significativas que me permitam agradecer com o devido merecimento a todos os que me formaram nesse tempo e me conduziram até aqui.

Obrigada...

Primeiramente **a Deus**, por ter me dado a oportunidade de fazer meu mestrado no Brasil, ter me dado a força, paciência e resiliência para estar longe da família e concluir essa jornada. E, principalmente, por ter colocado todas as pessoas que fizeram dessa experiência, um momento incrível, gratificante, agradável e proveitoso para minha vida, que irei descrever nas próximas linhas.

Aos meus pais, **Suyapa Paguada e Wilfredo Padilla**, pelo apoio incondicional, por estarem do meu lado e muitas vezes, sem entender muito do que eu fazia, escutavam através da chamada de vídeo sobre meus resultados e meus experimentos, sempre com curiosidade e interesse. Fizeram-me acreditar desde criança que tudo o que eu quisesse seria capaz de realizar.

Ao meu irmão, **Luis Fernando Paguada**, pelo carinho e apoio em tempos difíceis.

À minha irmã, **Cecilia Padilla**, por sempre estar ao meu lado, motivando-me, incentivando-me e por demonstrar o orgulho que tem de mim. Pelo riso fácil sempre nos momentos que eu mais precisei; pelo amor, carinho, paciência, e por ter se sacrificado muitas vezes por mim. Sabe que é minha irmãzinha que amo com todo meu coração.

Ao meu orientador, **Professor Roberto Cesar Lima-Júnior**, pela disponibilidade de me orientar, pelo acolhimento e ter me aberto as portas do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA). Foi uma honra ter a oportunidade de ter feito meu mestrado sob sua orientação. OBRIGADA por todos os ensinamentos, paciência, confiança, por cada hora dedicada para mim. Sem palavras para agradecer o aprendizado, apoio, incentivo e positivismo. O senhor não tem dimensão da minha admiração e respeito pelo ser humano que és, um exemplo de professor, investigador e amor pela ciência.

À **professora Deysi Wong**, pela delicadeza e disponibilidade, agradeço o carinho, atenção, pelo tempo dedicado aos meus experimentos e pela pronta resposta sempre que foi necessário.

Ao **professor Odorico Moraes**, pelo acolhimento no junto com as meninas Nathaly e Fernanda, por ficar por perto nos momentos difíceis da pandemia, brindando apoio, carinho e tempo de boas conversas, risadas e companhia. Grande pessoa!

Ao **professor Armênio Aguiar do Santos**, do Laboratório Escola Prof. Luis Capelo (LELC), por ter me aberto as portas do seu laboratório e tirar os meus melhores sorrisos entre copos de café e brincadeiras. Obrigada pela atenção em cada momento que foi necessário.

Ao **professor Rodrigo Siqueira**, por toda ajuda, pela atenção, dedicação e disponibilidade em cada momento que precisei, pelos conselhos e ensinamentos.

A todos os meus amigos do LAFICA, pela convivência diária, pela paciência em me ajudar e me apoiar em cada momento, Obrigada.

A minha amiga de caminhada e aprendizado, **Celia Choquenaira**. Não tenho palavras suficientes para agradecer você pelo apoio em cada momento. Obrigada pela atenção, dedicação, conselho, carinho e motivação, sobretudo nos tempos em que eu mais precisei, por sempre ter ficado por perto. Gratidão por sua amizade e vivências. Por ter me ensinado muito, por sua ajuda nos experimentos. Seu apoio e ajuda foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À **Aurilene Cajado**. Amiga, obrigada por ter me ajudado desde o começo, os primeiros experimentos que aprendi no LAFICA foram com você. Sempre vou lembrar disso. Agradeço pelo tempo dedicado para me explicar e pela paciência em cada momento sobretudo no começo, obrigada por cada vivência no laboratório fazendo experimentos.

À **Jussara Rodriguez**. Amiga, agradeço pela amizade, carinho e apoio, sobretudo nos momentos de cada palavra de motivação e positivismo. Por sua ajuda nos experimentos que foi essencial e cada uma das vivências no laboratório.

Lízias, Bruna, Lívia, Anamaria, Rafael, obrigada por todas as vivências e momentos felizes que me proporcionaram. Por terem me convidado em alguns dos seus experimentos e me permitirem aprender ainda mais.

Aos meus amigos/irmãos, **Maria Fernanda, Carlos Galo, Carlos Irias, Nathaly Mendoza, Celia Choquenaira, Ariane Texeira, Josué Paiva**. Pelo apoio em todos os momentos principalmente nos mais difíceis. Por terem me ajudado nessa caminhada, pela paciência, amizade e ficar por perto esses anos me dando palavras de apoio e carinho.

À minha amiga há mais de 10 anos, **Maria Fernanda**. Foi muito lindo viver essa experiência com você, agradeço o apoio em cada momento desde o dia que eu cheguei no Brasil, por ter me recebido e aberto as portas de casa para morar juntas. Gratidão por sua amizade, paciência, carinho, convivência e por todos os momentos que passamos, tanto os felizes quanto os difíceis em que precisamos da força uma da outra. Obrigada pelo apoio nos experimentos e por me acompanhar mesmo nos finais de semana quando foi necessário.

Às minhas amigas de Honduras, **Lilian Diaz e Litsy Zuniga**, grandes amigas, que sempre estiveram por perto mesmo quando distantes, apoiando-me nesta caminhada.

Ao técnico **Deomar Silva**, do Departamento de Patologia e Medicina Legal, pela amizade e disponibilidade na realização dos cortes histopatológicos.

A todo o pessoal do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, por me ajudarem sempre que necessário e pelo jeito amável de atender os alunos.

Ao programa de bolsas Brasil-PAEC, no âmbito do acordo de cooperação entre a Organização dos Estados Americanos (OEA) e o grupo Coimbra de Universidades Brasileiras (GCUB), pela oportunidade de fazer meu mestrado na Universidade Federal do Ceará.

Ao CNPq, CAPES e FUNCAP, pelo apoio financeiro e a todos que de alguma forma construíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E CARDIOPROTETORA DO ALFA-BISABOLOL SOBRE A CARDIOTOXICIDADE INDUZIDA POR DOXORRUBICINA EM CAMUNDONGOS C57BL/6

Introdução: A cardiotoxicidade é um efeito colateral decorrente do tratamento de pacientes oncológicos com antraciclinas. A doxorubicina é um dos fármacos mais frequentemente utilizados em diferentes tipos de câncer, adultos e pediátricos, incluindo o câncer de mama, o mais prevalente em mulheres. Infelizmente, apesar de sua eficácia, o significado clínico da incorporação da doxorubicina é prejudicado por seus efeitos adversos, que geralmente se manifestam como cardiotoxicidade em até anos após a interrupção do tratamento. Nesse sentido, é especialmente importante na pesquisa cardio-oncológica a identificação de terapias para retardar ou prevenir a ocorrência de complicações cardiovasculares. O alfa-bisabolol é um álcool sesquiterpênico com importante ação anti-inflamatória descrita. Assim, o presente trabalho objetivou investigar o papel do alfa-bisabolol sobre a cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina.

Metodologia: Camundongos C57BL/6 machos (25-25g) foram divididos em grupos (n=6/grupo) e tratados com Salina 0,9% (6 ml/kg + tween 20 2% i.p 1x/dia/19 dias), doxorubicina (4 mg/kg nos dias 0, 7 e 14) isoladamente ou 1 h antes de alfa-bisabolol (50 mg/kg, 1x/dia/19 dias) ou alfa-bisabolol isoladamente por 19 dias. A variação ponderal foi avaliada diariamente. No dia 20, avaliaram-se parâmetros eletrocardiográficos (ECG) e obteve-se uma amostra de sangue para análise bioquímica. Após a eutanásia, amostras de coração foram extraídas para estudos histopatológicos e inflamatórios. **Resultados:** A Doxorubicina induziu uma significativa perda de massa corpórea dos animais, acompanhada de perda de massa cardíaca, alterações histopatológicas caracterizadas pela redução da área de cardiomiócitos, parâmetros parcialmente atenuados de forma dose-dependente pelo tratamento com alfa-bisabolol ($p < 0.05$ vs. grupo doxorubicina). Ademais, essas alterações foram acompanhadas por alterações no ECG provocando prolongamentos das ondas ST, QRS, QTc, junto a uma diminuição na onda T. Tais alterações que foram moduladas pelo tratamento com alfa-bisabolol. Adicionalmente, a doxorubicina aumentou os níveis séricos de creatino-fosfoquinase fração MB (CK-BM), que está associada à lesão e morte dos cardiomiócitos. A resposta inflamatória é marcada pelo aumento de neutrófilos no tecido cardíaco e acompanhada pelo aumento da expressão de receptores Toll like receptor 9 (TLR-9) e Fosfoinositide 3 quinase gamma (PI3K-gamma), culminando com a produção de citocinas interleucina (IL-1beta, IL-6 e IL-10). Todos esses parâmetros foram significativamente modulados pelo tratamento com alfa-bisabolol ($p < 0.05$ vs. grupo doxorubicina). **Conclusão:** O alfa-bisabolol apresentou atividade anti-inflamatória, atenuando o desenvolvimento da cardiotoxicidade associada à doxorubicina.

Palavras-chave: Cardiotoxicidade, inflamação, PI3K-gama, TLR-9, IL-6, IL-1beta

ABSTRACT

ANTI-INFLAMMATORY AND CARDIOPROTECTIVE EFFECT OF ALPHA-BISABOLOL ON THE DOXORUBICIN-INDUCED CARDIOTOXICITY IN C57BL/6 MICE

Introduction: Cardiotoxicity is a side effect resulting from the treatment of cancer patients with anthracyclines. Doxorubicin is one of the most frequently drugs used for the management of several types of cancer in adults and pediatrics, including breast cancer, the most prevalent in women. Unfortunately, despite its effectiveness, the clinical significance of incorporating doxorubicin in cancer therapy is undermined by its toxicities. It is which usually manifested as cardiotoxicity up to years after discontinuation of treatment. It is then especially important in cardio-oncology research to identify therapies to delay or prevent the occurrence of doxorubicin-related cardiovascular complications. Alpha-bisabolol is a sesquiterpene alcohol with an important anti-inflammatory action described. The present study aimed to investigate the role of alpha-bisabolol on doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Methods:** C57BL/6 male mice (25-25g) were divided into groups (n=6/group) and injected with 0.9% saline (6 ml/kg + 2% tween 20 2% i.p 1xday/19 days, i.p.), doxorubicin (4 mg/kg on days 0, 7, and 14, i.p.) alone or 1 h before alpha-bisabolol (50 mg/kg, once daily/19 days, p.o.) or alpha-bisabolol alone for 19 days. Body mass change was assessed daily. On day 20, electrocardiographic (ECG) parameters were evaluated and a blood sample was obtained for biochemical analysis. After euthanasia, heart samples were extracted for histopathology and measuring inflammatory markers. **Results:** Doxorubicin induced a significant loss of body and cardiac masses, histopathological alterations characterized by the reduction of the cardiomyocyte area, parameters partially attenuated by the treatment with alpha-bisabolol ($p < 0.05$ vs. doxorubicin group). Additionally, these alterations were accompanied by alterations in the ECG causing prolongation of the ST, QRS, and QTc waves, together with a decrease in the T wave, alterations that were prevented by alpha-bisabolol. Besides, doxorubicin increased serum levels of creatine phosphokinase MB fraction (CK-BM), which was associated with cardiomyocyte injury and death and neutrophilic infiltrate. Inflammation response was marked by increased expression of neutrophils in cardiac tissue, accompanied by increased expression of Toll like receptors (TLR9) and phosphoinositide 3 kinase gamma (PI3K-gamma), culminating with the production of cytokines (IL-1beta, IL-6 and IL-10). All these parameters were significantly attenuated by alpha-bisabolol treatment ($p < 0.05$ vs. doxorubicin group). **Conclusion:** Alpha-bisabolol demonstrated an anti-inflammatory activity, attenuating the development of doxorubicin-associated cardiotoxicity.

Keywords: Cardiotoxicity, inflammation, PI3K-gamma, TLR-9, IL-6, IL1 Beta.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Os tipos de câncer mais comuns em homens e mulheres	17
Figura 2- Mecanismo de lesão celular e morte em células cancerosas e cardiomiócitos.	19
Figura 3- Mecanismos patógenicos de cardiotoxicidade induzida por doxorubicina .	21
Figura 4- Estrutura química do alfa-bisabolol.....	25
Figura 5- Resume do protocolo experimental	33
Figura 6- Registro do ECG em camundongos C57BL/6.....	34
Figura 7- Efeito do alfa-bisabolol sobre a variação da massa corpórea e índice cardíaco em camundongos injetados com doxorubicina	38
Figura 8- Efeito do alfa-bisabolol sobre a morfologia dos cardiomiócitos de animais injetados com doxorubicina.....	39
Figura 9- Efeito do alfa-bisabolol sobre as alterações eletrocardiográficas induzidas pela doxorubicina.....	41
Figura 10- Imagens representativas do traçado eletrocardiográfico de animais submetidos à cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina.....	44
Figura 11- Expressão de marcadores de dano cardíaco em animais submetidos à cardiotoxicidade por doxorubicina.....	44
Figura 12- Expressão de TLR-9 em camundongos submetidos à cardiotoxicidade por doxorubicina e efeito do a-bisabolol sobre a expressão deste receptor.....	46
Figura 13- Expressão de TLR-9 em camundongos submetidos à cardiotoxicidade por doxorubicina e efeito preventivo do alfa-bisabolol sobre essa expressão.....	47
Figura 14- Expressão de PI3K- γ em tecido cardíaco de animais submetidos à cardiotoxicidade por doxorubicina e efeito protetor do a-bisabolol.	48
Figura 15- Quantificação da área fluorescente relativamente à expressão de TLR-9 e PI3K- γ em coração de camundongos submetidos à cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina.....	49

Figura 16- Efeito do alfa-bisabolol sobre os níveis cardíacos de citocinas em animais submetidos à cardiotoxicidade associada à doxorrubicina..... 49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CK-MB	Creatina quinasa MB
CONCEA	Conselho Nacional de controle de experimentação animal
Cox-2	Ciclooxigenase-2
CRCs	Câncer colorretal
DNA	Ácido dexocirribonucleico
E.P.M.	Erro padrão da media
ECG	Eletrocardiograma
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimático
eNOS	Oxido nítrico sintetasa endotelial
H2O2	Peroxido de hidrogênio
H9C2	Línea Celular de cardiomiócitos
HSF-1	Fator de transcrição de choque térmico 1
Hsp25	Proteína de choque térmico 25
HTAB	Tampão de brometo de hexadeciltrimetilamonio
i.p	Intraperitoneal
IL-10	Interleucina 10
IL-1β	Interleucina 1- beta
IL-6	Interleucina 6
INCA	Instituto Nacional do câncer
iNOS	Oxido nítrico sintetasa induzível
IRE-BP	proteínas de ligação ao elemento responsivas ao ferro
MPO	Mieloperoxidase
NADH	Nicotinamida adenina de nucleotídeo
NADPH	nicotinamida adenina de nucleotídeo fosfato
NFκB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NO	Oxido Nítrico

OMS	Organização mundial da saúde
PI3Kγ	Fosfoinositide 3-kinase gamma
PI3Kγ	fosfoinositide 3-kinase gamma
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SERCA	Bomba ATPasa de Ca ⁺² do reticulo sarco/endoplasmático.
TLR-5	Receptor 5 tipo toll
TLR-9	Receptor 9 tipo toll
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
Topo 2	Topoisomerase II
VE	Ventrículo Esquerdo

LISTA DE SIMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
g	Gramma
Kg	Kilograma
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
Mm	Milimolar
Ph	Potencial hidrogenio
α	Alfa
β	Beta
μL	Microlitro
κ	Kappa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Câncer	16
1.2 Tratamentos do cancer	16
1.3 Antraciclinas	18
1.4 Mecanismo de Ação e patogênese das antraciclinas	18
1.5 alfa- bisabolol	23
2. JUSTIFICATIVA	26
3. OBJETIVOS	27
3.1 Geral	27
3.2 Específicos	27
4. MATERIAIS E METODOS	28
4.1 Equipamentos e instrumentos	28
4.2 Farmacos e soluções	29
4.2.1 Farmacos	29
4.2.2 Soluções	29
4.2.3 Corantes	29
4.3 Animais de experimentação	30
4.3.5 Eletrocardiograma	32
4.3.6 Índice cardíaco e análise histológica	33
4.3.4 Dosagem de creatinofosfoquinase fracção mb (CK-MB)	33
4.3.9 Mieloperoxidase	33
4.3.7 Imunohistoquímica	34
4.3.8 Imunofluorescência	35
4.3.10 Dosagem de citocinas inflamatórias por Elisa	36
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	36

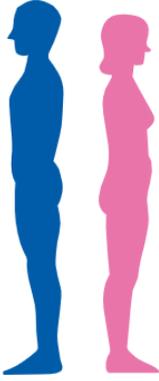
6. RESULTADOS -----	37
7. DISCUSSÃO -----	50
8. CONCLUSÃO -----	59
9. REFERÊNCIAS-----	60

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer é uma doença de alta incidência e mortalidade, sendo a segunda causa principal de mortes no mundo, o que representa um contínuo desafio a profissionais de saúde (SIEGEL et al., 2021). Os tipos de câncer mais comuns em relação ao sexo são: em homens – próstata, pulmão, brônquios e câncer colorretal (CCR), os quais representam 42% de todos os casos; e em mulheres – mama, pulmão e CCR, que coletivamente representam metade de todos os novos diagnósticos. O câncer de mama, por sua vez, é responsável por 30% de todos os novos diagnósticos de câncer em mulheres (**Figura 1**). De acordo com os últimos dados estatísticos, estima-se que a carga global de câncer se apresenta em torno de 28,4 milhões de casos em 2040, com um aumento de 47% a partir de 2020 (SUNG et al., 2021).

Figura 1- Os tipos de câncer mais comuns em homens e mulheres

Estimated New Cases							
				Males	Females		
Prostate	248,530	26%			Breast	281,550	30%
Lung & bronchus	119,100	12%			Lung & bronchus	116,660	13%
Colon & rectum	79,520	8%			Colon & rectum	69,980	8%
Urinary bladder	64,280	7%			Uterine corpus	66,570	7%
Melanoma of the skin	62,260	6%			Melanoma of the skin	43,850	5%
Kidney & renal pelvis	48,780	5%			Non-Hodgkin lymphoma	35,930	4%
Non-Hodgkin lymphoma	45,630	5%			Thyroid	32,130	3%
Oral cavity & pharynx	38,800	4%			Pancreas	28,480	3%
Leukemia	35,530	4%			Kidney & renal pelvis	27,300	3%
Pancreas	31,950	3%			Leukemia	25,560	3%
All Sites	970,250	100%	All Sites	927,910	100%		

Fonte: American Cancer Society, Cancer statistics, 2021

1.2 Tratamento do câncer

Muito se discute acerca da importância do tratamento do câncer em relação ao risco-benefício quando se fala em qualidade de vida do paciente. Dependendo do tipo de câncer e do estágio, encontram-se entre as opções de tratamento: radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal, terapias alvo direcionada e imunoterapia (WANG; LEI; HAN, 2018). A quimioterapia é geralmente considerada um método eficaz no manejo clínico do câncer e inclui fármacos derivados de plantas ou de origem semissintética ou

sintética. Dependendo do mecanismo de ação, encontram-se **agentes alquilantes**, como ciclofosfamida, ifosfamida e compostos platínicos; **antimetabólitos**, a exemplo do 5-fluorouracil, gemcitabina, capecitabina; os **inibidores do fuso mitótico**, como os taxanos, vimblastina e vincristina; **inibidores da topoisomerase I** (irinotecano e topotecano) e **II** (etoposídeo, teniposídeo e antraciclina como idarrubicina, daunorrubicina e doxorrubicina) (BUKOWSKI; KCIUK; KONTEK, 2020).

Independentemente do claro avanço terapêutico em termos de aumento de sobrevida, os pacientes são acometidos com incontáveis efeitos colaterais graves relacionados à quimioterapia, uma vez que o tratamento não é específico para células tumorais em proliferação, mas, também, geram impacto sobre as células normais, como o bulbo capilar, pele, medula óssea e células epiteliais do trato gastrointestinal. De forma interessante, os efeitos colaterais causados pelo tratamento quimioterápico dependem do tipo de droga utilizada, o tipo de câncer e sua localização, além de fatores individuais dos pacientes (WANG; LEI; HAN, 2018). Entre as toxicidades mais comuns podem-se citar: alopecia, náuseas e vômitos, anemia, fadiga, anorexia, dispepsia, mielossupressão. Entretanto, a quimioterapia clássica pode, também, levar ao surgimento de uma série de efeitos adversos característicos de determinados fármacos. Nesse contexto, podemos citar: mucosites gastrintestinais associadas ao uso de 5-fluorouracil e irinotecano; esteato-hepatite consequente ao irinotecano; osteonecrose de mandíbula induzida por ácido zoledrônico; neuropatias sensitivas periféricas ligadas ao uso de oxaliplatina e vincristina; cistite hemorrágica por ciclofosfamida e ifosfamida; além de cardiomiopatia dose-dependente, uma complicação frequente em pacientes em uso das antraciclina (HENRIKSEN, 2018).

1.3 Antraciclina

As antraciclina são derivadas de pigmentos do fungo *Streptomyces peucetius* var. *Caesius*. A doxorrubicina junto com epirrubicina, daunorrubicina e idarrubicina, pertencem à família das antraciclina (OCTAVIA et al., 2012). A mais utilizada das antraciclina é a doxorrubicina, cujas propriedades citotóxicas foram identificadas no ano 1950, tendo sido clinicamente aprovada como um medicamento anticâncer no ano 1963 (WENNINGMANN et al., 2019). É considerada um potente agente antineoplásico, estando entre os quimioterápicos mais utilizados no tratamento de diferentes tipos de

tumores sólidos, como câncer de mama, pulmão, câncer de ovário, testicular e tumores hematológicos, linfomas e leucemias (NAJAFI et al., 2020).

A despeito da sua eficácia, a cardiotoxicidade é um dos efeitos colaterais mais graves (HENRIKSEN, 2018). A cardiotoxicidade relacionada a antracíclicos é uma complicação dose-dependente que pode afetar 9% dos pacientes tratados, manifestando-se em praticamente todos os pacientes no primeiro ano do tratamento quimioterápico (CARDINALE et al., 2015) e cuja patogênese ainda envolve grande debate.

As manifestações clínicas tóxicas induzidas por doxorrubicina podem ser cardiotoxicidade aguda e cardiomiopatia crônica (MA et al., 2020). A administração da antraciclina está associada à lesão de cardiomiócitos dose-dependente, levando à disfunção do ventrículo esquerdo (VE) e alterações graves na condução elétrica. (OCTAVIA et al., 2012) (HENRIKSEN, 2018) (SILVA et al., 2018).

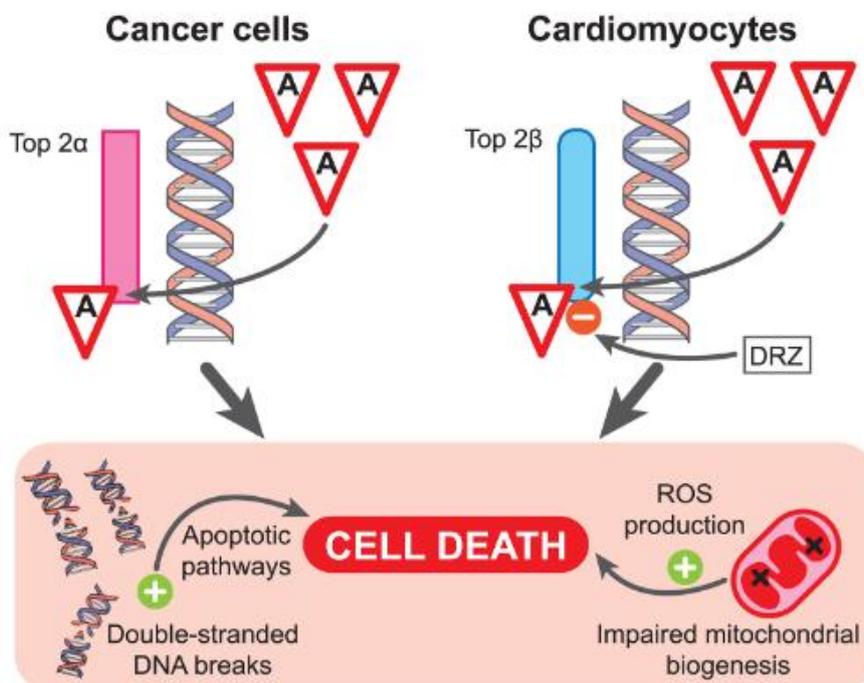
A remodelação elétrica é um processo que acontece nas fases iniciais da patologia cardíaca e as arritmias geralmente acontecem como suas manifestações tardias. A remodelação elétrica está interrelacionada com a remodelação estrutural em diversas patologias cardíacas e a identificação dessas alterações no ECG é de grande importância diagnóstica e prognóstica (BACHAROVA, 2007). As alterações no ECG induzidas pela doxorrubicina em modelos de camundongos incluem: prolongamentos do complexo QRS, intervalo QT, segmento ST, diminuição da onda P e T (WARHOL et al., 2021) (DANESI; DEL TACCA; SOLDANI, 1986).

As manifestações cardiotóxicas associadas ao tratamento do câncer de mama incluem pericardite, isquemia miocárdica, hipertensão, anormalidades de condução e doença tromboembólica (CARON; NOHRIA, 2018). A incidência de insuficiência cardíaca é de aproximadamente 3 a 5% com uma dose cumulativa de 400 mg/m² de doxorrubicina e a incidência de complicações é de 48% com o aumento da dose total do fármaco resultante para 700 mg/m² (ZAMORANO et al., 2016). Além disso, tem sido mencionada a diferença de gênero como um dos fatores de risco aumentado, relatando-se que mulheres desenvolvem toxicidade mais grave do que homens. Outros fatores de risco têm sido mencionados, como a idade, idosos e crianças são mais suscetíveis, e administração simultânea com outros medicamentos cardiotóxicos (OCTAVIA et al., 2012).

1.4 Mecanismo de ação e patogênese da cardiotoxicidade das antraciclina

A ação descrita para as antraciclina envolve sua ligação aos pares de bases de DNA e topoisomerase II (Top2) para formar um complexo ternário Top2-doxorrubicina-DNA. Tal mecanismo desencadeia a morte celular, por impedir a síntese de DNA e RNA (TEWEY et al., 1984). A inibição da top2 α e β causa o acúmulo de quebras em ambas as fitas de DNA e causa disfunção mitocondrial, levando à ativação das vias de morte celular e ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROS) (HENRIKSEN, 2018) (**Figura 2**). O mecanismo antineoplásico chave da doxorrubicina é, conseqüentemente, a inibição da top2 α , altamente expressa em células tumorais em proliferação rápida (OCTAVIA et al., 2012). No caso da inibição da top2 β , observa-se uma ativação da via supressora tumoral p53, além de uma disfunção mitocondrial e aumento da apoptose (MCGOWAN et al., 2017). Este segundo mecanismo contribui para a cardiotoxicidade.

Figura 2- Mecanismo de lesão celular e morte em células tumorais e cardiomiócitos.



Mecanismo de lesão de células cancerosas e cardiomiócitos induzido por antraciclina. O efeito terapêutico das antraciclina contra as células cancerosas é mediado pela inibição de Top 2 α . No caso da inibição Top 2 β leva à lesão nos cardiomiócitos. A inibição da Top2 em ambos tipos celulares induz a acumulação de quebras de DNA em ambas fitas e disfunção mitocondrial que leva à ativação de vias de morte e acumulação de EROS.

Adaptado de (HENRIKSEN, 2018)

Os mecanismos patogênicos da cardiomiopatia por doxorrubicina ainda não foram totalmente elucidados, porém além de danos ao DNA mitocondrial pela inibição de Top2 β , os mecanismos que envolvem as vias intrínseca e extrínseca da apoptose são críticas nesse processo de desenvolvimento da cardiotoxicidade. A formação de EROS pode ser induzida na presença de enzimas oxirredutoras como P450 redutase, NADH desidrogenase e xantina oxidase. Por sua vez, o grupamento quinona da doxorrubicina pode sofrer reações redox (PODYACHEVA et al., 2021).

A NADPH é uma co-enzima importante que promove a formação de EROS no ciclo redox. As NOX ajudam a converter a fração quinona em um radical semiquinona que pode reagir com o oxigênio para formar peróxido de hidrogênio e oxidases de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH). Foi, ainda, demonstrado que a isoforma NOX2 que é uma das sete diferentes isoformas de NADPH oxidase é o principal mediador de EROS derivados de NOX (SILVA et al., 2018).

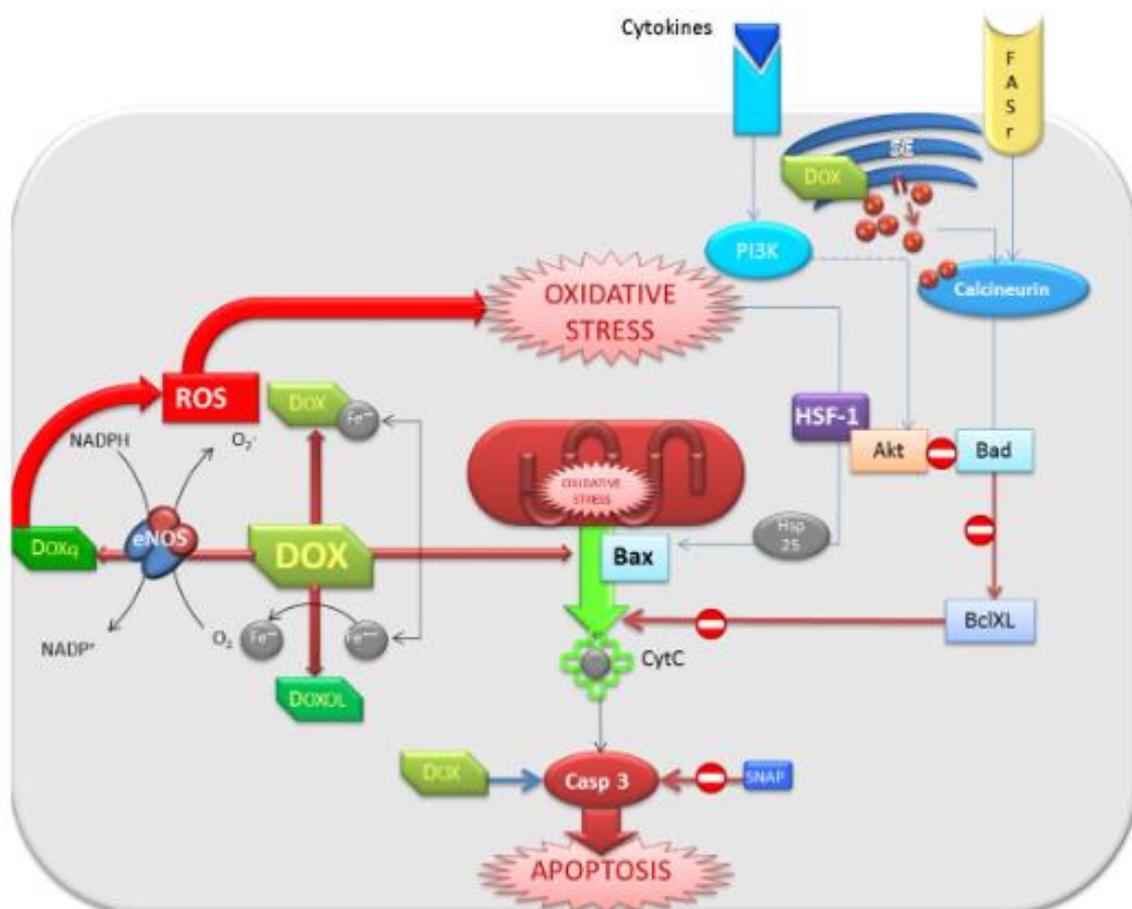
O papel do óxido nítrico (NO) na formação de EROS também já foi descrito. O NO é um vasodilatador que medeia funções cardiovasculares em condições homeostáticas normais. Por outro lado, um nível aumentado de NO é observado na cardiomiopatia por doxorrubicina (SILVA et al., 2018). Um estudo demonstrou que a exclusão ou superprodução de eNOS em camundongos pode melhorar ou piorar a função cardíaca após uso de doxorrubicina em comparação com animais selvagens cuja expressão é normal (NEILAN et al., 2007)

Em paralelo, o estresse oxidativo provoca a ativação dos reguladores do apoptose, proteína associada à família BCL-2 (BAX), que ativa a liberação do citocromo c pelos poros da membrana mitocondrial, e esse processo induz a cascata de caspases de ativação das vias intrínseca e extrínseca do apoptose, que acaba levando à morte dos cardiomiócitos e ao comprometimento da função contrátil (OCTAVIA et al., 2012) (**Figura 3**). Nos modelos de cardiotoxicidade, o estresse oxidativo ativa o HSF-1, que produz uma proteína do choque térmico, a Hsp25, que contribui estabilizando a p53 e aumenta a produção de proteínas pró-apoptóticas (OCTAVIA et al., 2012) (**Figura 3**).

Um estudo realizado em células H9C2 demonstrou os eventos sequenciais de mecanismos moleculares mediado pelo NADPH/EROS, destacando a importância do fator nuclear- κ B (NF- κ B), além da sinalização de quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK_{1/2}) e outras quinases ativadas por mitógeno desencadeando apoptose

dos cardiomiócitos (ZHAO; ZHANG, 2017). A sinalização por NF- κ B é o ponto convergente no qual as cascatas de sinal subsequentes são ativadas, incluindo interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), interleucina 1-beta (IL-1beta), além de outras citocinas inflamatórias críticas na resposta inflamatória da doxorrubina (VYAS; LAPUT; VYAS, 2014).

Figura 3- Mecanismos patogênicos de cardiotoxicidade induzida por doxorrubina



Interação da doxorrubina com diferentes mecanismos patogênicos e vias apoptóticas do cardiomiócito. O começo da formação de EROS é mediante a interação com eNOS e nas mitocôndrias a doxorrubina causa a liberação de citocromo C oxidase e também induz o prolongamento do tempo de abertura dos canais de cálcio no retículo sarcoplasmático. A fosforilação de Akt inibe a ativação de Bad que é uma das principais vias antiapoptóticas. O aumento da geração de EROS também ativa HSF-1 e produz mais Hsp25, o que causa o aumento de proteínas pró-apoptóticas.

(OCTAVIA et al., 2012)

As mitocôndrias são as organelas intracelulares mais prejudicadas pela exposição à doxorrubina. Um dos fatores mais contribuintes para o acúmulo de

doxorubicina na membrana mitocondrial interna é sua alta afinidade a cardiolipina, formando um complexo quase irreversível, rompendo a interface cardiolipina-proteína e resultando em maior formação de radicais superóxido. A cardiolipina é um fosfolípido presente na membrana mitocondrial, tendo um papel de estabilizar a estrutura mitocondrial, função, metabolismo energético cardíaco e sobrevivência celular (SCHLAME; RUA; GREENBERG, 2000).

Em um modelo de cardiomiopatia crônica induzida por doxorubicina em ratos, foi demonstrada uma transição geral do metabolismo aeróbico para anaeróbico do musculo cardíaco. Isso está ligado a uma diminuição na oxidação de ácidos graxos de cadeia longa nas mitocôndrias cardíacas e um aumento no metabolismo da glicose (PODYACHEVA et al., 2021).

A ferroptose é outro mecanismo descrito envolvido na cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina e que ocorre como consequência da oxidação lipídica. É uma morte celular dependente de ferro, que pode ser evitada mediante quelação de ferro (STOCKWELL et al., 2017). Estudos mostraram que o metabolismo do ferro é mediado por proteínas que sequestram e se ligam ao ferro intracelular. A formação do complexo FE-S é uns dos mecanismos descritos da aconitase citoplasmática/ IRE-BP (proteínas de ligação aos elementos responsivos ao ferro), aumentando a estabilidade do mRNA da transferrina e impedindo a tradução de proteínas de sequestro de ferro (MINOTTI et al., 2004)

A desregulação do cálcio como mencionado anteriormente é outro mecanismo conhecido. O doxorubicinol, metabólito hidroxílico da doxorubina, é conhecido por afetar a homeostase do cálcio por vários mecanismos, incluindo a modulação da bomba Ca^{2+} -ATPase (SERCA) do retículo sarco/endoplasmático (MITRY; EDWARDS, 2016). A diminuição os níveis de expressão gênica das proteínas do retículo sarcoplasmático, responsáveis pelo transporte de cálcio é considerada a causa básica da homeostase alterada do cálcio (KALIVENDI et al., 2005).

Outros estudos mostraram a implicação da autofagia na cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina. Investigações conduzidas em células H9C2 indicaram que a doxorubicina aumenta a produção de vacúolos autofágicos. O mesmo acúmulo de vacúolos autofágicos também foi mostrado em corações de ratos expostos à doxorubicina (KOLEINI; KARDAMI, 2017).

O conhecimento dos mecanismos patogênicos da cardiotoxicidade associada à doxorrubicina tem aberto uma plêiade de potenciais alvos terapêuticos. Um estudo recente relatou que a ativação enzima fosfoinosítide 3-quinase gamma (PI3K γ) tem uma ação importante na cardiotoxicidade induzida por doxorrubicina. Nesse sentido, camundongos nocaute para a porção catalítica da PI3K γ (*Pi3ky kinase-dead*) ou que receberam inibidores seletivos de PI3K γ e que foram submetidos a tratamento crônico com doxorrubicina apresentaram uma proteção contra o desenvolvimento da cardiotoxicidade (LI et al., 2018). Tal efeito foi acompanhado por uma menor autofagia e resposta inflamatória. Um ponto relevante acerca da sinalização celular, foi a demonstração de que receptores toll-like tipo 9 (TLR-9) são importantes intermediários na ativação da fosfoinosítideo 3-quinase gamma (PI3K γ) (LI et al., 2018). Em paralelo, a inibição deste alvo enzimático contribuiu para a potencialização da redução do crescimento tumoral (LI et al., 2018). De forma translacional, amostras de biópsia de pacientes com cardiotoxicidade consequente ao uso de doxorrubicina apresentaram alta expressão de PI3K γ (LI et al., 2018).

De maneira complementar, Guo e colaboradores, (2020), mostraram que a deficiência de TLR-9 alivia a cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina através da regulação da autofagia *in vivo* e *in vitro*. O papel de TLRs parece ser bem amplo, visto que outro estudo demonstrou que a deleção do TLR-5 leva a efeitos protetores similares em camundongos (MA et al., 2020).

De forma interessante, alguns compostos terpenos como o nerolidol tem mostrado um importante papel na proteção da cardiotoxicidade induzida com doxorrubicina, atenuando estresse oxidativo, inflamação e apoptose modulando as vias de sinalização Nrf2/MAPK (ARUNACHALAM et al., 2021), além do geraniol modulando negativamente a sinalização NF-kB e ativando a sinalização da via Nrf2/OH-1 (YOUNIS et al., 2021).

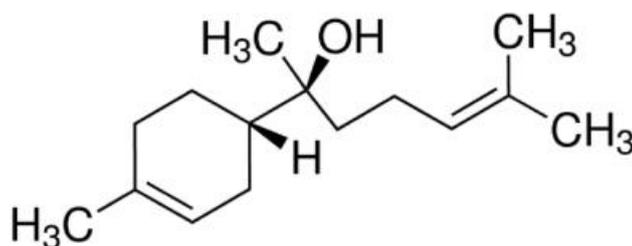
Como evidenciado anteriormente, uma importante e potencial alternativa para diminuir a cardiotoxicidade causada por doxorrubicina envolve a modulação de vias inflamatórias e oxidativas. Produtos naturais com essas propriedades, como os terpenos, têm grande perspectiva. Nesse sentido, o alfa-bisabolol, um álcool sesquiterpênico, é uma substância que é caracterizada pelos seus efeitos anti-inflamatórios já descritos (JAVED et al., 2020).

1.5 alfa-bisabolol

O alfa-bisabolol alfa,4-dimetil-alfa-(4-metil-3-pentenil)-3-ciclohexeno-1-metanol, também referido como levomenol, com uma massa molecular de 222,37 g/mol (C₁₅H₂₆O), foi isolado pela primeira vez em 1951 por Isaac (BRUNKE; HAMMERSCHMIDT, 1985), é um álcool sesquiterpeno monocíclico. Os sesquiterpenos (C₁₅) são formados biossinteticamente a partir de três unidades de isopreno de cinco carbonos (KAMATOU; VILJOEN, 2010) (**Figura 4**).

O sesquiterpeno alfa-bisabolol é obtido de plantas incluindo camomila (*chamomilla recutita L*), que é uma das fontes mais exploradas. O óleo essencial desta pode conter até 50-90% de a-bisabolol em sua constituição (ORAV; RAAL; ARAK, 2010). Outras plantas que contêm uma menor porcentagem de bisabolol são: Salvia (*Salvia runcinata*) >60%, e *Salvia stenophylla* até 46,5% (KAMATOU; VILJOEN, 2010), *Plinia cerrocampenesi*, 48,8% (ORAV; RAAL; ARAK, 2010), e madeira de candeia *Eremanthus erythropappus*, até 85% (KAMATOU; VILJOEN, 2010a). O alfa-bisabolol, gerou interesse devido ao seu potencial terapêutico e a suas múltiplas propriedades farmacológicas que já foram identificadas como anti-inflamatório, antioxidante, anti-infeccioso, anticâncer, cardioprotetor (NAGOOR MEERAN et al., 2020).

Figura 4- Estrutura química do alfa-bisabolol



Fonte: (WU et al., 2018)

O efeito anti-inflamatório do alfa-bisabolol tem sido muito investigado. Foi evidenciado que pode estar ligado à inibição de algumas proteínas, como óxido nítrico

sintase induzível (iNOS), ciclooxygenase-2 (Cox-2) e os fatores de transcrição NF-kB, ERK e p38 (MUNOZ-PEREZ et al., 2018). Além disso, foi estudada sua atividade analgésica e anti-inflamatória induzida por carragenina, além de ser capaz de diminuir a migração de leucócitos e a produção de TNF-alfa em cavidade peritoneal estimulada por carragenina (ROCHA et al., 2011).

O alfa-bisabolol também foi estudado em modelos de doenças neurodegenerativas como doença de Parkinson, mostrando resultados significativos na modulação do estresse oxidativo, neuroinflamação, e apoptose (JAVED et al., 2020). Em outros estudos o alfa-bisabolol também mostrou efeitos citotóxicos em células de câncer de pulmão A459, mediante a indução da parada do ciclo celular, a apoptose, disfunção mitocondrial e inibição das vias de sinalização da PI3K/Akt (WU et al., 2018). Em células de câncer endometrial demonstrou um aumento da sensibilidade das células à radioterapia, sendo uma alternativa para superar a radioresistência (FANG et al., 2019). Além disso, apresentou atividade anti-amiliodogênica em células PC12 (SHANMUGANATHAN et al., 2018).

Em um estudo que avaliou o potencial de toxicidade do alfa-bisabolol obtido do óleo da camomila, observou-se a ausência de manifestações tóxicas desse sesquiterpeno quando administrado a ratos grávidos por gavagem em doses de até 1000 mg/kg diariamente por 6 a 15 dias. Contudo, em concentrações superiores houve uma redução significativa do número de fetos implantados. Além disso, houve uma redução do consumo de ração (HERNÁNDEZ-CERUELOS et al., 2007).

Além disso, tem sido relatada a sua baixa toxicidade oral. Em um estudo, foi mostrado que a administração da dose de 2.000 mg/kg confirmou a ausência de toxicidade após administração oral aguda do alfa-bisabolol (Registration Dossier- ECHA). Ademais, é aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) e listado como substância reconhecida como segura para uso em alimentos e bebidas (KAMATOU; VILJOEN, 2010).

Em modelos de infarto de miocárdio, o alfa-bisabolol mostrou uma potente resposta inflamatória, disfunção lisossomal, e reduzir a ativação do inflamassoma NLRP3 e da via TLR-4-NF-kB/MAPK, além de modular a disfunção do fluxo autofágico (NAGOOR MEERAN et al., 2020) e, de inibir os canais de cálcio dependentes de voltagem (DE SIQUEIRA et al., 2014).

Esses achados nos motivaram a avaliar o potencial antiinflamatório e cardioprotetor do alfa-bisabolol no modelo de cardiotoxicidade induzida por doxorubicina.

2. JUSTIFICATIVA

As antraciclinas estão entre os quimioterápicos mais utilizados e mais potentes, para diferentes tipos de câncer incluindo o câncer de mama. A epirrubicina, daunorrubicina, idarrubicina e doxorrubicina são as antraciclinas mais utilizadas. No entanto, essa família de antineoplásicos acarreta um efeito cardiotoxíco dose-dependente que pode não apenas trazer complicações e intercorrências durante o tratamento quimioterápico, mas também após o término do tratamento.

Estudos recentes evidenciaram a capacidade de monoterpenos, como o geraniol, e sesquiterpenos, como o nerolidol, em atenuar a cardiotoxicidade relacionada à doxorrubicina. Um mecanismo potencial envolvido na cardioproteção demonstrada por esses terpenos envolve o aumento da expressão das vias PI3K/Akt, Nrf2/HO-1, da capacidade antioxidante total, redução da sinalização de NF- κ B e dos níveis de citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β) e interleucina-18 (IL-18), além de reduzir a expressão de óxido nítrico sintase induzida e de ciclooxigenase-2. Com base nessas evidências, moléculas estreitamente relacionadas, como o alfa-bisabolol, um álcool sesquiterpênico, e que já demonstraram atividade anti-inflamatória em outros modelos, como o de infarto do miocárdio induzido por agonistas beta-adrenérgicos, são candidatos promissores para prevenir a cardiotoxicidade induzida por doxorrubicina. Este, portanto, é o objetivo principal do presente trabalho.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliação do efeito anti-inflamatório e cardioprotetor do alfa-bisabolol em modelo de cardiotoxicidade induzida por doxorubicina em camungongos C57BL/6.

3.2 Específicos

- Caracterizar a indução da cardiotoxicidade experimental induzida por doxorubicina segundo parâmetros eletrofisiológicos e bioquímicos.
- Caracterizar os efeitos eletrofisiológicos cardíacos do alfa-bisabolol isoladamente.
- Determinar a influência do alfa-bisabolol sobre as alterações morfológicas cardíacas e eletrocardiográficas associadas à cardiotoxicidade.
- Avaliar o perfil de expressão de marcadores inflamatórios durante a cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina, bem como o efeito do alfa-bisabolol sobre esses parâmetros.

4. MATERIAIS E METODOS

4.1 Equipamentos e instrumentos

- Agitador magnético TE 089
- Agitador vordex cetormart MV
- Balança analítica de precisão, FA2104N
- Balança Filiozola MF
- Capela de exaustão de gases
- Centrífuga refrigerada Eppendorf 5804-R
- Espectrofotômetro Biotek ELX800
- Estufa shel lab
- Freezer -80°C Thermo Scientific
- Homogenizador de soluções AP 22 Phoenix Lufenco
- Balão volumétrico (50,100,1000 ml)
- Beaker (50, 100, 200, 500 ml)
- Cassetes de histologia
- Cubeta 1ml
- Funis de vidro
- Lâmina lisa para microscopia 26x76 mm
- Lamínula 24x32mm
- Lâmina com xilano da dako
- Micrótomo Leica
- Máquina de inclusão em parafina Leica
- Material Cirúrgico
- Micropipeta multicanal Gilson (200 µl)
- Micropipetas eppendorf (2, 10, 20,200 e1000 µl)
- Microscópio óptico Olympus BX41
- Placa estéril de 96 poços
- Tubos falcon (15, 50ml)
- Proveta (10, 25, 50,100, 1000 ml)

4.2 Drogas e soluções

4.2.1 Drogas

- Cloridrato de doxorubicina (Evorubicin[®], 50 mg/frasco-ampola, Farmarin, Montevideú, Uruguai).
- alfa-bisabolol (Código do produto #14462, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil)
- Tribromoetanol 2,5% (T48402, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil)
- Cloridrato de quetamina (Quetamina, 10 g/100 mL, ampolas contendo 10 mL, Vetnil, São Paulo, Brasil)
- Cloridrato de xilazina 2% (Xilazin[®], 2 g/100 mL, ampolas contendo 10 mL, Syntec, São Paulo, Brasil)
- Heparina sódica (HEMofol[®], 5000 U/mL, ampolas com 5,0 ml, Cristália, São Paulo, Brasil)

4.2.2 Soluções

- Formol tamponado 10%
- Ácido sulfúrico 100%
- Álcool Etílico 50%, 70%, 90%, 100%
- Peróxido de hidrogênio 30%
- Solução salina estéril (NaCl 0,9%)
- Tampão 1 para MPO (NaCl, EDTA dissódico e tampão fosfato de sódio)
- Tampão de lise (NaCl a 0,2%)
- Tampão fosfato de sódio (Tampão HTAB – hexadeciltrimetilamonio-brometo)

4.2.3 Corantes

- Hematoxilina (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil)
- Eosina (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil)

4.3 Animais

Os protocolos foram realizados no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA), localizado no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), Universidade Federal do Ceará (UFC). Os experimentos foram conduzidos conforme as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC), protocolado sob o CEUA N° 9897291019.

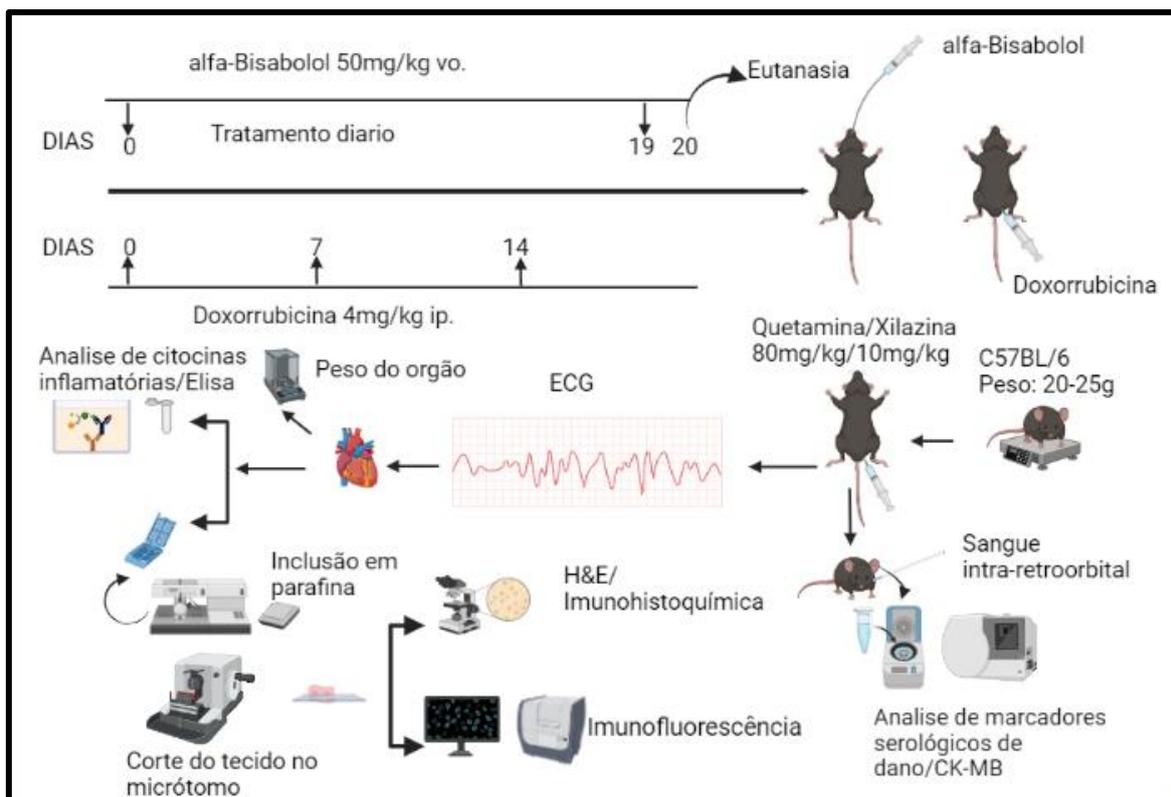
Para o modelo experimental *in vivo* foram utilizados camundongos machos isogênicos da linhagem C57BL/6, com peso entre 20 e 25g. Os animais foram fornecidos pelo biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFC. Em cada grupo experimental foram utilizados 6 camundongos que permaneceram em gaiolas em um ambiente com temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ em um ciclo de 12h claro /12h escuro, com livre acesso a água e ração padrão *ad libitum*, respeitando o número máximo de animais por gaiola.

4.3.1 Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos experimentais, conforme a seguir:

1. **Veículo:** Camundongos tratado com solução tween 80 a 2% em salina 0,9%, v.o.
2. **Doxorrubicina (Dox):** Para simular os regimes terapêuticos humanos em doses que cursam com cardiotoxicidade (dose cumulativa de 450 mg/m^2 , o que equivale a aproximadamente 12 mg/kg em humanos), administrou-se aos camundongos uma dose cumulativa total de 12 mg/kg da doxorrubicina escalonada em três injeções por via i.p. Cada injeção aplicada nos dias 0, 7 e 14 correspondente a uma dose de 4 mg/kg/dia (ZHAO et al., 2010). A doxorrubicina foi diluída em solução fisiológica 0,9%.
3. **Dox + alfa-bisabolol:** Para padronização da melhor dose, administrou-se alfa-bisabolol (5, 10 ou 50 mg/kg , uma vez ao dia por 19 dias. v.o.). Nos dias em que a Dox foi administrada, a administração do alfa-bisabolol foi realizada 1 h antes da injeção do quimioterápico. O alfa-bisabolol foi dissolvido em Tween 80 a 2% em solução fisiológica 0,9%.
4. **alfa-bisabolol:** Camundongos tratados somente com o a-bisabolol (50 mg/kg , uma vez ao dia por 19 dias v.o.).

Figura 5- Resumo do protocolo experimental



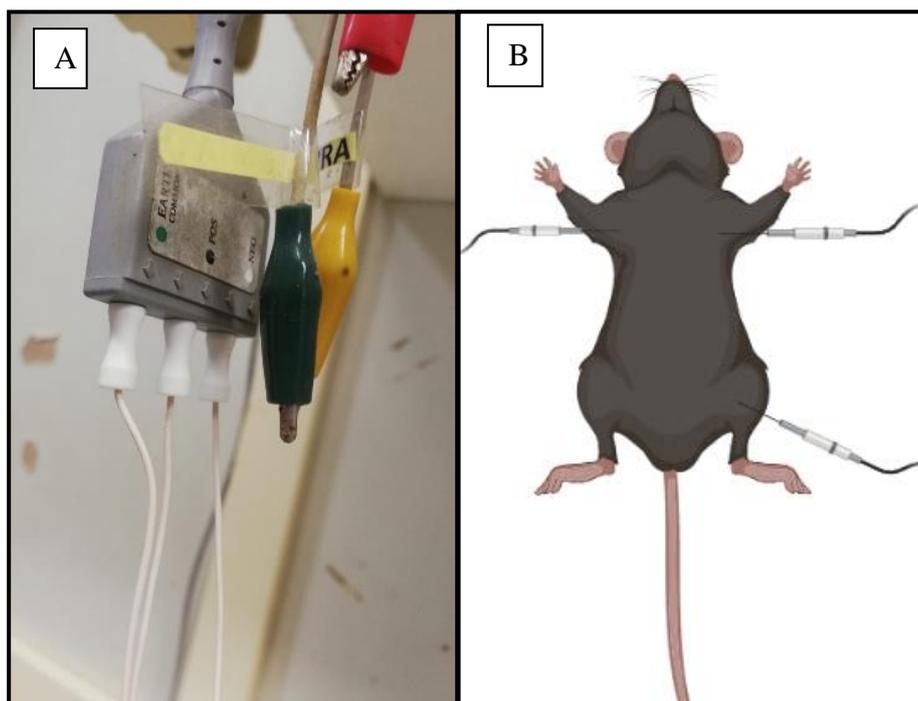
Esquema do protocolo experimental. No dia 0, 7 e 14 injetou-se doxorrubicina 4 mg/kg, i.p. Alfa-bisabolol foi administrado diariamente do dia 0 até o dia 19. Nos dias de injeção de doxorrubicina, o alfa-bisabolol foi administrado 1h antes do quimioterápico. No dia da eutanásia, os animais foram pesados e, após a anestesia, realizou-se o eletrocardiograma (ECG) e foi coletado sangue (20 µl) para análise bioquímica. Realizou-se, ainda, a coleta do coração para posteriores análises de marcadores de lesão cardíaca, análise histopatológica, imunofluorescência e dosagem de citocinas.

Fonte: Elaborado pelo autor

4.3.2 Eletrocardiograma

As leituras do eletrocardiograma (ECG) foram obtidas ao final do tratamento para cada um dos grupos experimentais. O ECG foi realizado em camundongos sob anestesia i.p, utilizou-se a mistura de quetamina (80mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) (Chaves et al, 2003). O registro foi realizado com o aparelho Power Lab 8SP/AD Instruments (Laboratório Escola Professor Luís Capelo – LELC) e, analisado pelo software LabChard/AD Instruments. Cada canal foi amplificado a uma taxa de 20Hz e uma velocidade de 2k/s, usou-se a configuração de derivação II. A análise dos eletrocardiogramas envolveu os parâmetros QT(s), QRS (s), R-R (s), R (mV), T(mV).

Figura 6- Registro do ECG em camundongos C57BL/6



Resumo do protocolo experimental do eletrocardiograma. A) Imagem dos eletrodos DEN-12SAF: 12mm x 29 gauge, 48”, para medição dos parâmetros eletrocardiográficos. B) Os animais foram anestesiados e para cada um deles realizou-se uma estabilização durante um tempo de 10 min. Posteriormente, o animal foi posicionado em uma base plana, deitado em posição supino e imobilizados com fita para colocação dos eletrodos. O registro eletrocardiográfico foi realizado por 15 min para cada animal.

Fonte: Elaborado pelo autor

4.3.3 Índice cardíaco e análise histológica

Após o registro ECG, os camundongos foram eutanasiados para coleta do coração, o qual foi pesado em balança de precisão. Posteriormente, extraiu-se a tíbia para medida do comprimento e realização do cálculo do índice cardíaco determinado pela seguinte fórmula: [peso do órgão/comprimento da tíbia] x 100.

Para a análise histológica, o ventrículo esquerdo foi coletado, fixado em formol tamponado 10% e incluído em parafina para obtenção de seções de 3 µm em micrótomo (Leica RM 2235) do Departamento de Patologia e Medicina Legal da UFC. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) e visualizados em microscópio na objetiva 50 × (Nikon DS-Ri1). A área dos cardiomiócitos foi medida utilizando o Software ImageJ com barra de escala de 30 µm.

4.3.4 Dosagem de creatinofosfoquinase – fração MB (CK-MB)

O princípio da técnica se baseia na reação da amostra com o reagente contendo anticorpo específico para a subunidade CK-M. A atividade do monômero CK-B é medida pela sequência de reações onde a CK-B catalisa a desfosforilação da creatina fosfato para produzir adenina trifosfato (ATP), que reage com a glicose em presença de hexoquinase (HK), formando glicose-6-fosfato. A glicose-6-fosfato, em presença de glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH), é oxidada a 6-fosfogluconato (6-PG) e reduz o NAD a NADH. A velocidade da reação ao comprimento de 340 nm é proporcional à atividade da CK-B na amostra (SCHUMANN et al., 2002).

Para a dosagem, coletou-se sangue do plexo retro-orbital via um capilar hematológico em tubo eppendorf heparinizado, seguido de centrifugação para separação do plasma. Foi utilizado o kit da Labtest Liquiform para Creatinofosfoquinase-MB (CK-MB), conforme recomendações do fabricante. Realizou-se a leitura no comprimento de onda de 340 nm em espectrofotômetro termostaticado.

4.3.5 Mieloperoxidase

A quantificação do infiltrado neutrofílico no coração dos camundongos após a indução da cardiotoxicidade foi determinado pelo ensaio da atividade de MPO, uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos e utilizada como marcador da infiltração de neutrófilos no tecido inflamado.

Um fragmento do ventrículo esquerdo foi coletado de cada animal, pesado e incubado com 200 μ L de tampão gelado (NaCl 0,1 M, NaPO₄ 0,02 M, NaEDTA 0,015 M; pH: 4,7). Posteriormente, os tecidos foram homogeneizados com o auxílio do aparelho tissue lyser e centrifugados a 1.600 g durante 15 min a 4°C. O pellet formado foi ressuspenso com 1000 μ L de solução NaCl 0,2%. Após nova centrifugação, o pellet foi ressuspenso em tampão NaPO₄ 0,05 M (pH: 5,4) contendo 5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB). Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 18.000 g por 15 min a 4°C. Em seguida, coletaram-se 50 μ L do sobrenadante, o qual foi plaqueado em placa de 96 poços para o ensaio. Em cada um dos poços foram, ainda, adicionados 25 μ L de TMB (3,3,3,3-tetramethylbenzidine; 406 mM) e 100 μ L H₂O₂ (0,5 mM) e a placa foi incubada na estufa por 5 min a 37 °C. Por fim, a reação foi parada com 75 μ L de ácido sulfúrico 4M (ALVES-FILHO et al., 2006).

A quantificação foi realizada a partir da curva padrão de neutrófilos (75000 neutrófilos/50 μ L, no primeiro poço). A leitura foi registrada em espectrofotômetro ao comprimento de onda de 450 nm, e os resultados foram expressos como número de neutrófilos/ mg de tecido.

4.3.6 Imunohistoquímica para TLR-9

As amostras de coração foram fixadas em formol tamponado 10% e posteriormente incluídas em parafina, cortadas com micrótomo (4 μ m) e dispostas em lâminas silanizadas para microscopia Dako (Ref. K8020, Agilent Technologies do Brasil, Dako Dinamarca, Dinamarca). Posteriormente, o tecido foi desparafinado em estufa a 60 °C por 60 min, seguido de xileno e reidratado em uma série graduada de álcool etílico. O tampão citrato 10 mM pH:6 foi utilizado para a recuperação antigênica (incubação por 30 min em temperatura de 95°C em banho-maria). A atividade do peróxido de hidrogênio foi bloqueada com H₂O₂ 3% por 30 min. O bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado com BSA 5% por 30 min antes da incubação com o anticorpo primários anti-TLR-9 (cat N: IMG-305B, monoclonal mouse antibody), em diluições de 1:100 a 4°C por 12 h em uma câmara úmida com PBS. Após esse período, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo secundário Dako Envision + Dual Link system-HRP por 30 min a temperatura ambiente. O método estreptavidina-peroxidase foi usado para detectar os complexos antígeno-anticorpo, e diaminobenzidina (DAB) foi usada como cromógeno. Finalmente os cortes foram corados com hematoxilina e todas as seções foram analisadas

pela contabilização do número de células marcadas por campo em aumento de 200 × (YUJING FAN; BINGRONG LIU,2015).

4.3.7 Imunofluorescência para TLR-9 e PI3Kgamma

As amostras de coração foram fixadas em formol tamponado 10% e posteriormente incluídas em parafina, cortadas com micrótomo (4 µm) e dispostas em lâminas silanizadas para microscopia Dako (Ref. K8020, Agilent Technologies do Brasil, Dako Dinamarca, Dinamarca). Posteriormente, o tecido foi desparafinado em estufa a 60 °C por 60 min, seguido de xileno e reidratado em uma série graduada de álcool etílico. Em seguida, foi realizada a recuperação antigênica em tampão citrato de sódio 10 mM (pH: 6), a temperatura de 95 °C, por 18 min, seguida de resfriamento a temperatura ambiente durante 20 min. Depois, realizou-se a permeabilização da membrana por 10 min utilizando o triton X-100 0,1% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) e o bloqueio de ligações inespecíficas utilizando glicina 0,3% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) diluída em albumina sérica bovina BSA 5% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA), durante 30 min. Em seguida, os tecidos foram incubados com anticorpos primários rabbit anti-mouse PI3K-γ (1:200, Cell Signaling Technology®, Danvers, MA, EUA) ou anti-mouse TLR9 (1:100, cat N: IMG-305B, monoclonal mouse). Posteriormente, foi realizada a incubação com o anticorpo secundário donkey anti-igG de rabbit Alexa Fluor 568 (1:400, Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) ou donkey anti-igG de mouse (1:200, Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) durante 90 min. Após incubação com DAPI (Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) durante 30 min, realizou-se a montagem das lâminas com Prolong Gold Antifade Mountant (Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Para obtenção das fotomicrografias foi utilizado o aparelho Cytation 3 Biotek (sala multiusuário do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos – NPDM). As fotomicrografias foram analisadas utilizando o software de imagem Fiji image J (National Institutes of Health, Washington, DC, EUA) e a intensidade de fluorescência medida em percentual de área marcada.

4.3.8 Dosagem de citocinas por ELISA

Para avaliar os níveis de citocinas no tecido cardíaco (IL-1beta, IL-6 e IL-10), utilizou-se o kit ELISA R&D Systems, conforme as instruções do fabricante. Resumidamente, placas para ELISA de 96 poços foram incubadas por 12h a 4°C com anticorpo anti-IL-1, IL-6 ou anti-IL10. Após bloqueio das placas, as amostras e a curva padrão foram adicionadas em duplicata e incubadas por 24h a 4°C. As placas foram, então, lavadas três vezes com solução tampão e incubadas com anticorpo monoclonal biotilado anti-IL-1, IL-6 ou anti-IL-10 (diluídos 1:1000 em tampão de ensaio com BSA 1%). Após o período de incubação à temperatura ambiente por 1h, as placas foram lavadas e 50 µL do complexo HRP-avidina diluído 1:5000 foram adicionados. O reagente de cor o-fenilenodiamina (OPD, 50 µL) foi adicionado (15 min de incubação no escuro a 37°C) e a reação enzimática parada com H₂SO₄ 2M. A absorbância foi medida a 490 nm e o resultado foi expresso em pg/mg proteína.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o software GraphPad Prisma[®], versão 6.0. A normalidade dos dados foi previamente avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk para, em seguida, serem empregados os testes One-way ou Two-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, ou Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn, conforme propriedade respectivamente para dados paramétricos e não paramétricos. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M (erro padrão da média) para variáveis com distribuição normal, ou pela mediana (mínimo-máximo) para variáveis sem distribuição normal, sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

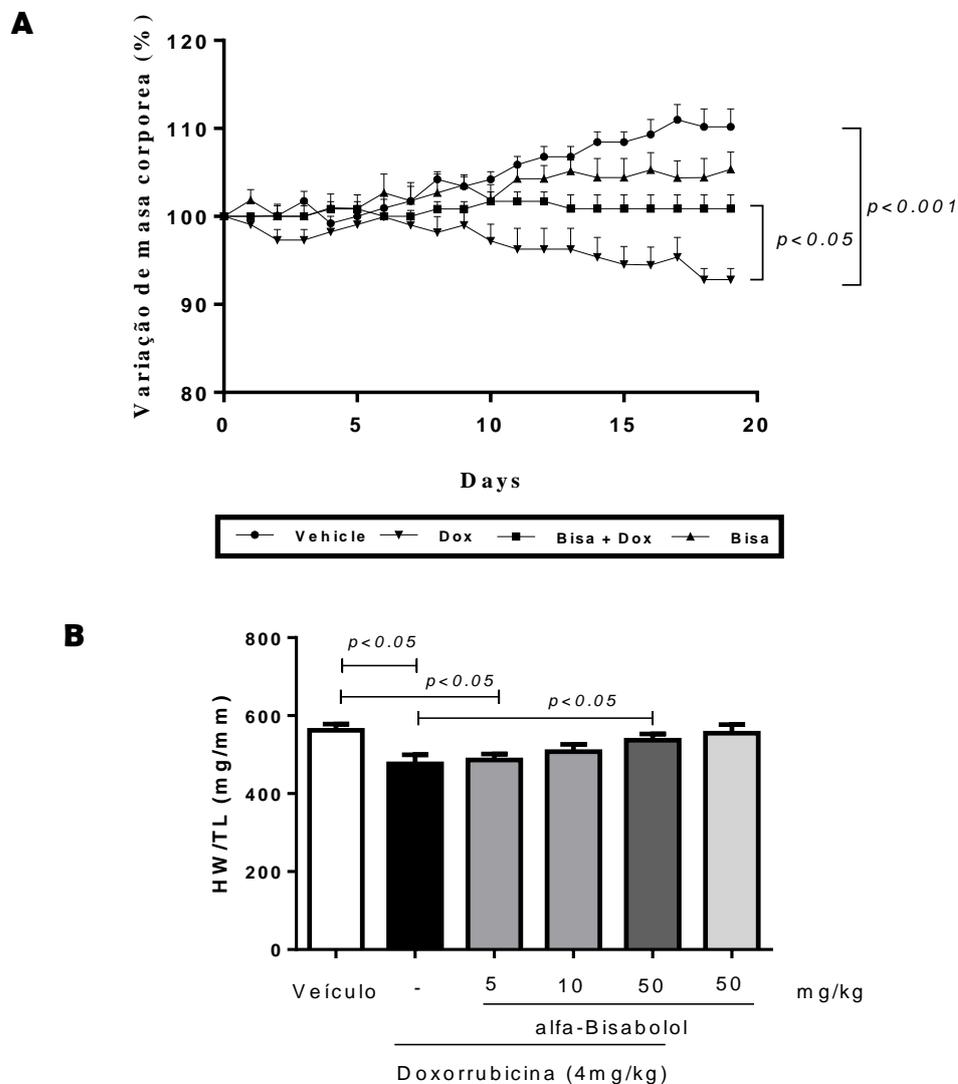
6. RESULTADOS

6.1 Avaliação do efeito cardioprotetor do alfa-bisabolol.

A administração da dose cumulativa de 12 mg/kg de doxorubicina nos camundongos induziu uma significativa perda de massa corpórea a partir do dia 7 (**Figura 7A**) e se manteve até o dia da eutanásia, o que foi parcialmente prevenido pela administração do alfa-bisabolol. Adicionalmente, a doxorubicina reduziu a razão entre o peso do coração e o comprimento da tíbia (HW/TL). Por outro lado, o tratamento com alfa-bisabolol preveniu a alteração deste índice cardíaco de forma dose-dependente (**Figura 7B**) em comparação com o grupo da doxorubicina ($p < 0,05$).

Está bem estabelecido que entre as principais anomalias da cardiotoxicidade relacionada a doxorubicina são a lesão em miócitos cardíacos, caracterizado por fibrose tecidual e apoptose celular. Notavelmente, esse padrão foi bem caracterizado em nosso estudo, visto que a doxorubicina induziu uma redução na área dos cardiomiócitos, ilustrado de forma representativa na (**Figura 8A**) e cuja mensuração é representada na (**Figura 8B**). De forma dose-dependente, o pré-tratamento com o alfa-bisabolol, que foi administrado em doses de 5, 10 ou 50 mg/kg, na dose de 50mg/kg preveniu tais alterações (**Figura 8A e 8B**), quando comparado com o grupo tratado com doxorubicina ($p < 0,05$).

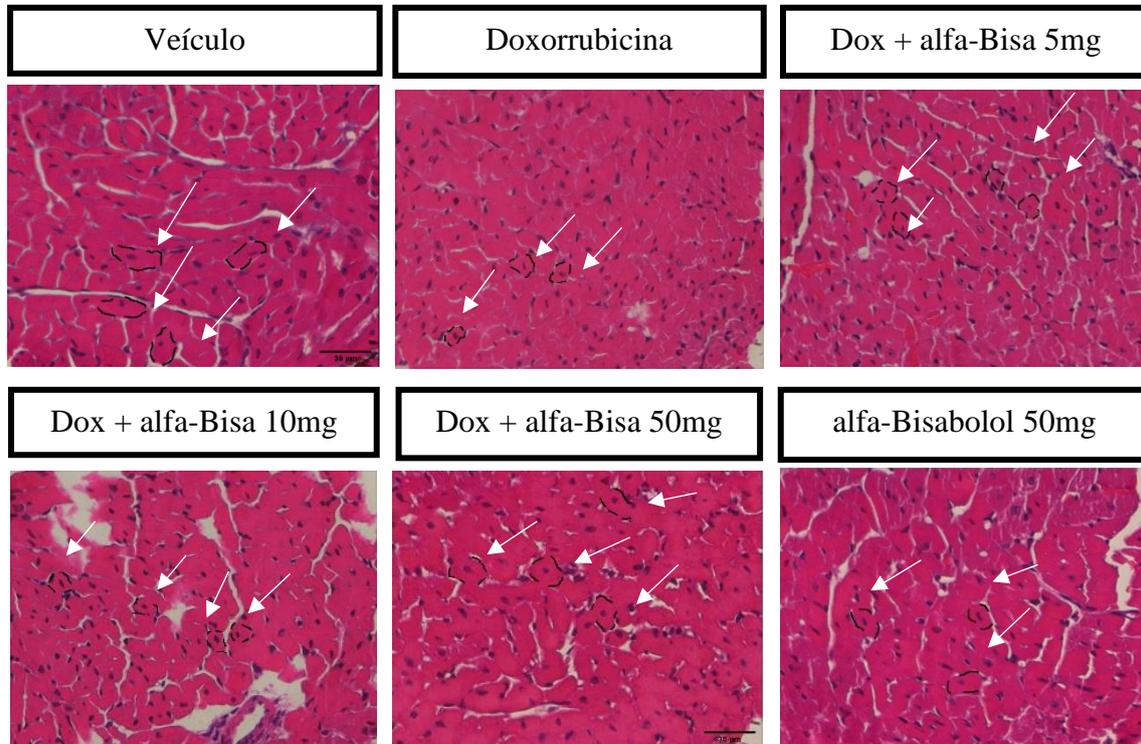
Figura 7- Efeito do alfa-bisabolol sobre a variação da massa corpórea e índice cardíaco em camundongos injetados com doxorrubicina.



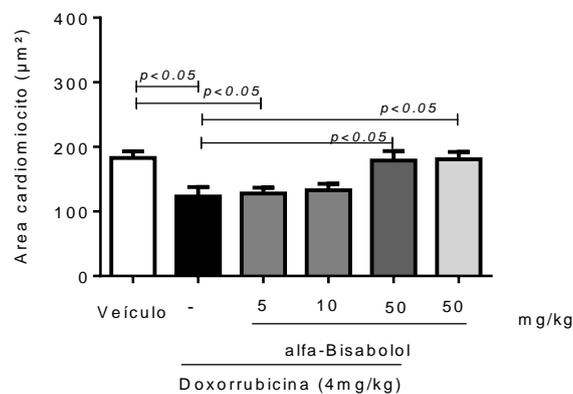
(A) Variação da massa corporal de camundongos C57BL/6 ($n=6$ /grupo). A doxorrubicina induz uma significativa perda da massa corpórea em função do tempo em comparação com o grupo controle. O tratamento com o alfa-bisabolol atenua essa perda versus o grupo doxorrubicina. (B) Medida do índice cardíaco (Razão entre o peso do coração e o comprimento da tibia). Em resposta à injeção com doxorrubicina, o índice cardíaco reduz significativamente em relação ao grupo controle, o que é prevenido pelo tratamento com alfa-bisabolol. Os valores são expressos como média \pm E.P.M, sendo consideradas estatisticamente significativas quando o valor de $P < 0,05$. No gráfico, de esquerda para direita, a barra branca é o grupo veículo, a preta é o grupo tratado com a doxorrubicina, as cinzas são os grupos pre-tratados com o alfa-bisabolol nas doses de 5 e 10 mg/kg, a cinza escuro é o pré-tratamento com o alfa-bisabolol na dose de 50 mg/kg, e o a última barra de cinza claro é o grupo tratado só com o alfa-bisabolol.

Figura 8- Efeito do alfa-bisabolol sobre a morfologia dos cardiomiócitos de animais injetados com doxorubicina.

A



B



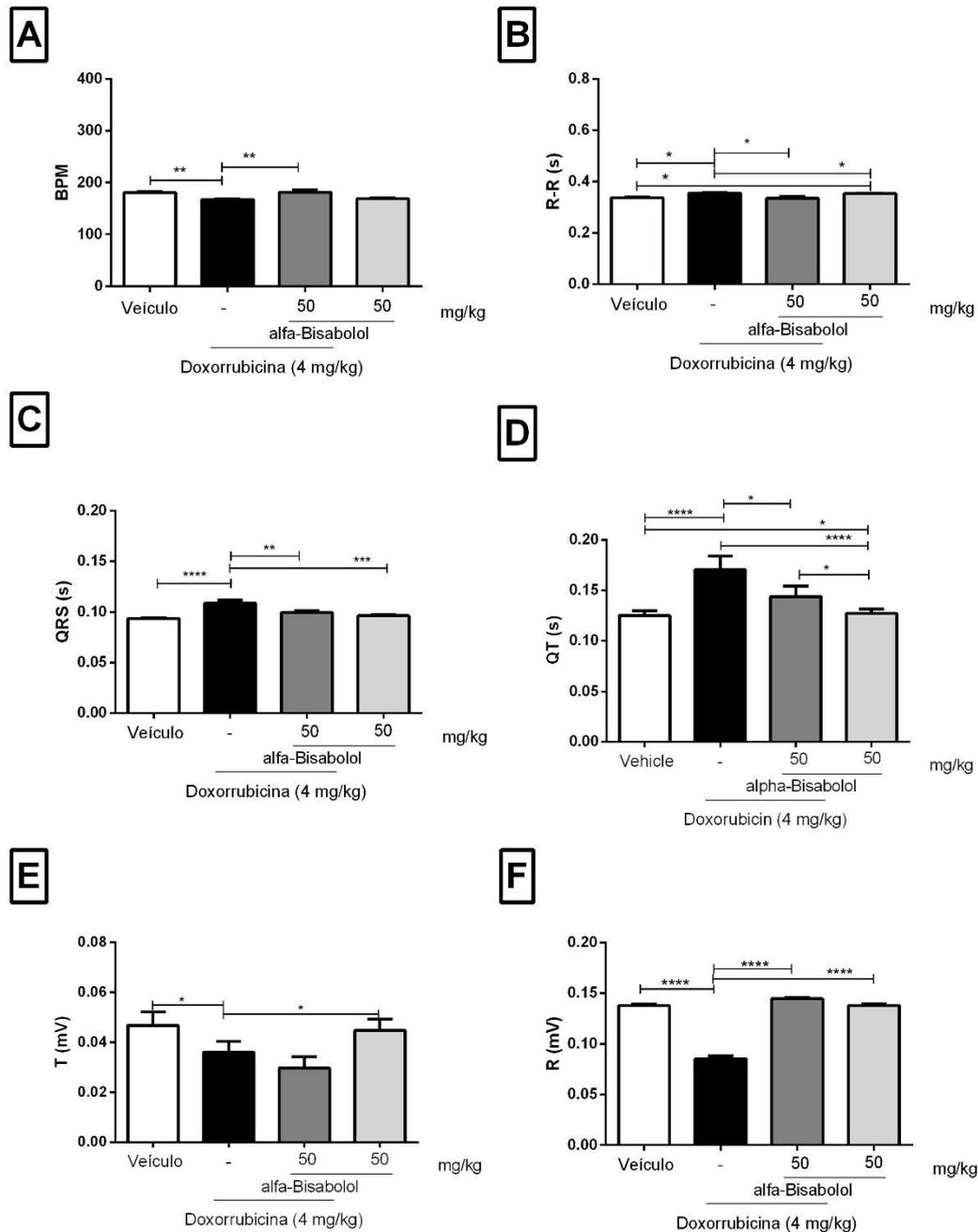
(A) Imagens representativas da área dos cardiomiócitos de animais tratados com veículo, doxorubicina administrada isoladamente ou associada ao alfa-bisabolol. Realizou-se uma coloração por H&E e a área quantificada pelo software Image J. As setas brancas estão sinalizando o cardiomiócito. (B) Quantificação da área dos cardiomiócitos. Os valores são expressos como média \pm E.P.M, sendo consideradas estatisticamente significativas quando o valor de $P < 0,05$. (Barra de escala = 30 μ m). No gráfico de esquerda para direita, a barra branca é o grupo veículo, a preta é o grupo tratado com a doxorubicina, as cinzas são os grupos pre-tratados com o alfa-bisabolol nas doses de 5 e 10 mg/kg, a cinza escuro é o pré-tratamento com o alfa-bisabolol na dose de 50 mg/kg, e o a última barra de cinza claro é o grupo tratado só com o alfa-bisabolol.

6.2 Avaliação da atividade Eletrocardiográfica

O resultado das alterações eletrocardiográficas associadas à administração de doxorubicina é apresentado nas **Figuras 9 e 10**. Como demonstrado na **Figura 9**, a injeção de doxorubicina reduziu a frequência cardíaca (**Figura 9A**), com valor médio de ($167,5 \pm 2,5$), comparado com o veículo que tem um valor médio de frequência cardíaca de ($180,7 \pm 6,47$). Além disso, a doxorubicina aumentou o intervalo R-R (**Figura 9B**), complexo QRS (**Figura 9C**), e causou alongamento do intervalo QT (**Figura 9E**) e apresentou uma diminuição da altura da onda T (**Figura 9E**) e da onda R (**Figura 9F**) se comparado ao grupo veículo ($p < 0,05$). No caso do tratamento isolado com o alfa-bisabolol, apresentou-se um comportamento semelhante ao veículo nos parâmetros eletrocardiográficos complexo QRS, intervalo QT, e da amplitude T e R, demonstrando que o tratamento isolado não produz alterações na condutividade. Contudo, no intervalo R-R apresentou um prolongamento significativo comparado com o veículo ($p < 0,05$), que foi acompanhado com redução da frequência cardíaca ($169,0 \pm 3,28$). De forma consistente ao descrito sobre as alterações morfológicas, o pré-tratamento com o alfa-bisabolol não induziu alterações graves nos parâmetros ECG apresentando uma frequência cardíaca ($181,8 \pm 10,30$), e uma diminuição dos parâmetros QRS, QT, e aumentou a amplitude da onda R versus ao grupo doxorubicina ($p < 0,05$), sugerindo uma preservação da função da condutividade, porém de forma paralela foi observada uma diminuição significativa da onda T quando comparado com o veículo ($p < 0,05$).

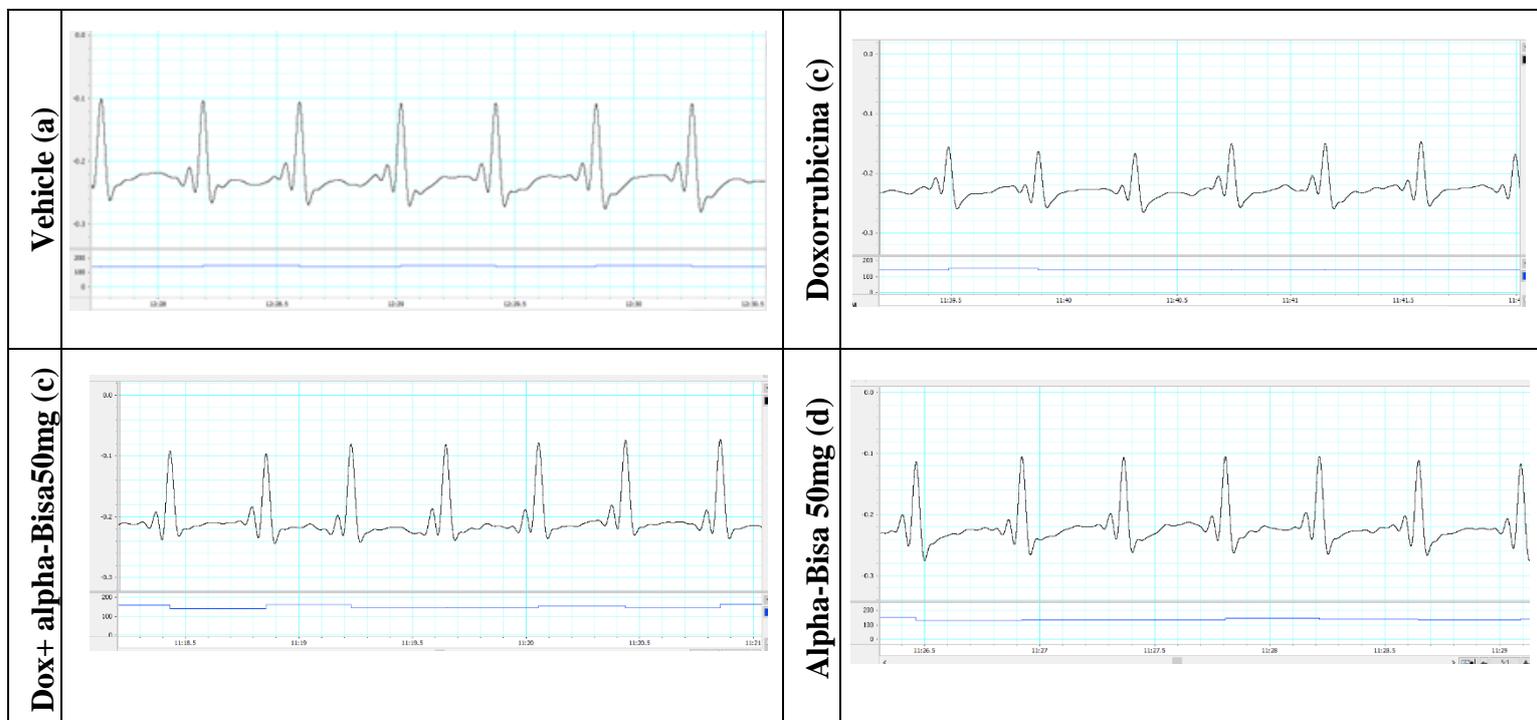
A **Figura 10** indica traçados representativos dos achados no ECG em cada grupo experimental. O traçado do grupo tratado com o alfa-bisabolol + doxorubicina (**Figura 9c**) mostra uma diminuição dos alongamentos do complexo QRS e intervalo QT acompanhado de um aumento na amplitude nesses intervalos quando comparado com o traçado do grupo tratado com doxorubicina (**Figura 9b**), reproduzindo os achados nas mensurações. No traçado, pode se observar que o tratamento isolado com o alfa-bisabolol não mostrou alterações na condutividade, porém observou-se alteração na ritmicidade do músculo cardíaco evidenciado com um prolongamento no intervalo R-R ($p < 0,05$), e representado no traçado ECG (**Figura 9d**) comparado com o traçado (**Figura 9a**).

Figura 9- Efeito do alfa-bisabolol sobre as alterações eletrocardiográficas induzidas pela doxorubicina.



A cardiotoxicidade foi induzida mediante administração de doxorubicina (4 mg/kg, i.p., nos dias 0, 7 e 14). Adicionalmente, um grupo de animais foi tratado diariamente com alfa-bisabolol (50 mg/kg, v.o.). (A) Frequência cardíaca, (B) intervalo R-R, (C) complexo QRS, (D) intervalo QT, (E) amplitude da onda T, (F) amplitude da onda R foram monitorados. Os dados indicam que a doxorubicina altera todos esses parâmetros, o que é prevenido pelo alfa-bisabolol de forma parcial. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ ***/**** $p < 0.001$.

Figura 10- Imagens representativas do traçado eletrocardiográfico de animais submetidos à cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina.



Os animais foram tratados com veículo (Salina 0,9% 5,60 ml/kg + tween 20 2% i.p 1xdia/19 dias), doxorubicina (4 mg/kg, dias 0, 7, 14) isoladamente ou associado com alfa-bisabolol (50 mg/kg, 1xdia/19 dias) ou alfa-bisabolol isoladamente por 19 dias. Após anestesia dos animais, realizou-se o registro ECG. Os traçados foram obtidos por 15 min. (A) ECG do grupo controle; (B) ECG do grupo doxorubicina com alongamento do intervalo R-R, alongamento do intervalo QTc, alongamento do intervalo ST em comparação com o grupo controle; (C) Evidencia o ECG do grupo tratado com doxorubicina + alfa-bisabolol, indicando melhora no intervalo R-R e QTc, e uma diminuição do intervalo T; (D) ECG do grupo de alfa-bisabolol isolado que apresenta um alongamento do intervalo R-R versus o grupo controle e uma diminuição na frequência cardíaca. Os valores numéricos representam as médias estatísticas dos parâmetros.

6.3 Avaliação do dano cardíaco.

O dano cardíaco sob o tratamento com a doxorubicina foi evidenciado pelo aumento da concentração sérica de queatinofosfoquinase fração MB (CK-MB) (**Figura 11A**), a sua concentração elevada correlaciona-se com o desenvolvimento da cardiotoxicidade.

6.4 Avaliação da atividade anti-inflamatória do alfa-bisabolol

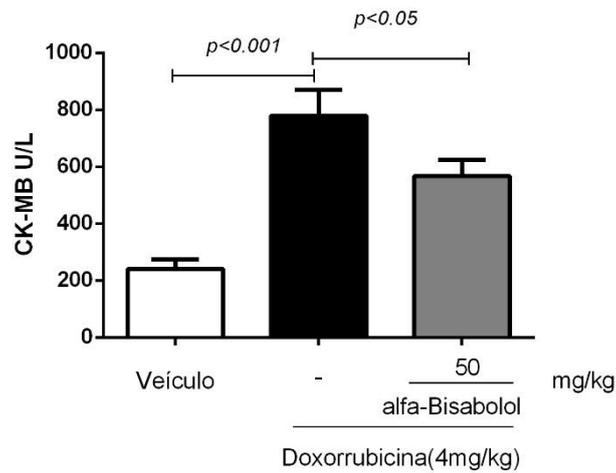
A cardiotoxicidade associada à doxorrubicina é marcada por um processo inflamatório. Nesse sentido, observamos que a doxorrubicina induziu cardiotoxicidade marcada pelo aumento da atividade de mieloperoxidase em tecido cardíaco (**Figura 11B**). Ambos esses parâmetros de dano cardíaco foram atenuados pelo pré-tratamento com alfa-bisabolol (**Figura 11A e B**). O tratamento com alfa-bisabolol *per se* não induziu inflamação.

O dano tecidual na cardiotoxicidade relacionada à doxorrubicina é acompanhado pela liberação de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), que leva à ativação de receptores *toll-like* e as vias de sinalização associadas. Ao medirmos a expressão de TLR9 por imunohistoquímica, observamos que a doxorrubicina aumentou significativamente o número de células marcadas com TLR9 (**Figura 12A e B**) quando comparado ao grupo veículo ($p<0,05$). Adicionalmente, o alfa-bisabolol reduziu a imunoposição desse receptor versus o grupo doxorrubicina (**Figura 12A e B**, $p<0,05$). Esses achados foram confirmados por imunofluorescência (**Figura 13**), cuja expressão foi quantificada e expressa em termos de percentual de área fluorescente (**Figura 15A**). De forma interessante, a PI3K- γ , uma enzima *downstream* à ativação do TLR9 durante a manifestação da cardiotoxicidade da doxorrubicina, apresentou-se aumentada no grupo que recebeu o quimioterápico (ilustrado na **Figura 14** e o resultado da quantificação representado na **Figura 15B**) versus uma baixa expressão no grupo veículo ($p<0,05$). De maneira consistente, o tratamento dos animais com alfa-bisabolol reduziu essa expressão (**Figura 14 e 15B**).

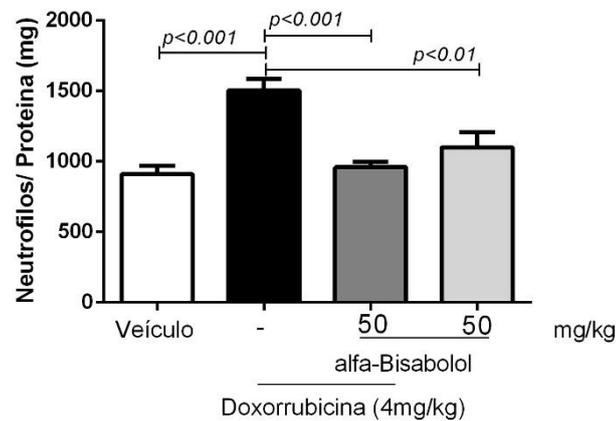
Esse processo foi acompanhado pelo aumento significativo dos níveis de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β (**Figura 16A**) e IL-6 (**Figura 16B**) e da citocina anti-inflamatória IL-10 (**Figura 16C**) comparado ao grupo controle tratado com veículo ($p<0,05$). Alinhado às evidências anteriores, o pré-tratamento com o alfa-bisabolol preveniu o aumento dessas citocinas quando comparado ao grupo que recebeu apenas doxorrubicina (**Figura 16A–C**, $p<0,05$).

Figura 11- Expressão de marcadores de dano cardíaco em animais submetidos à cardiotoxicidade por doxorubicina.

A

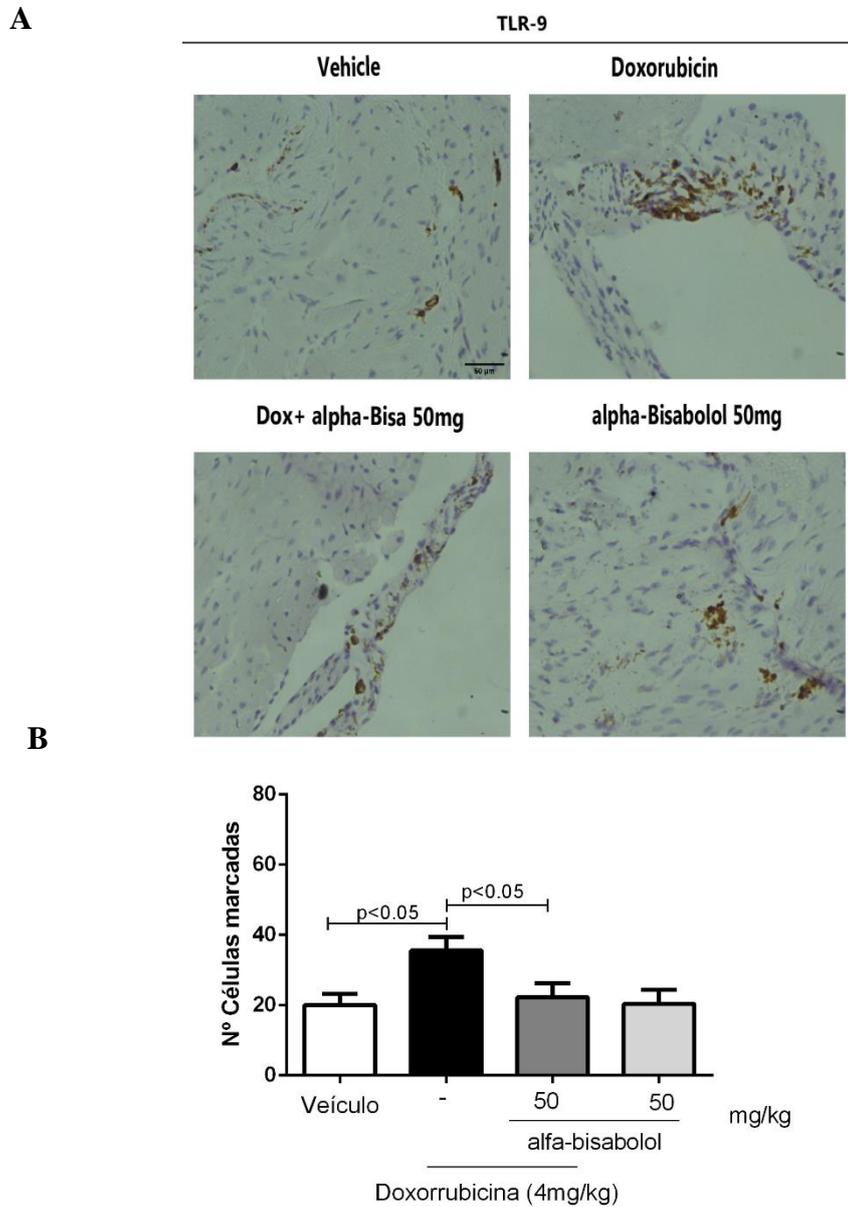


B



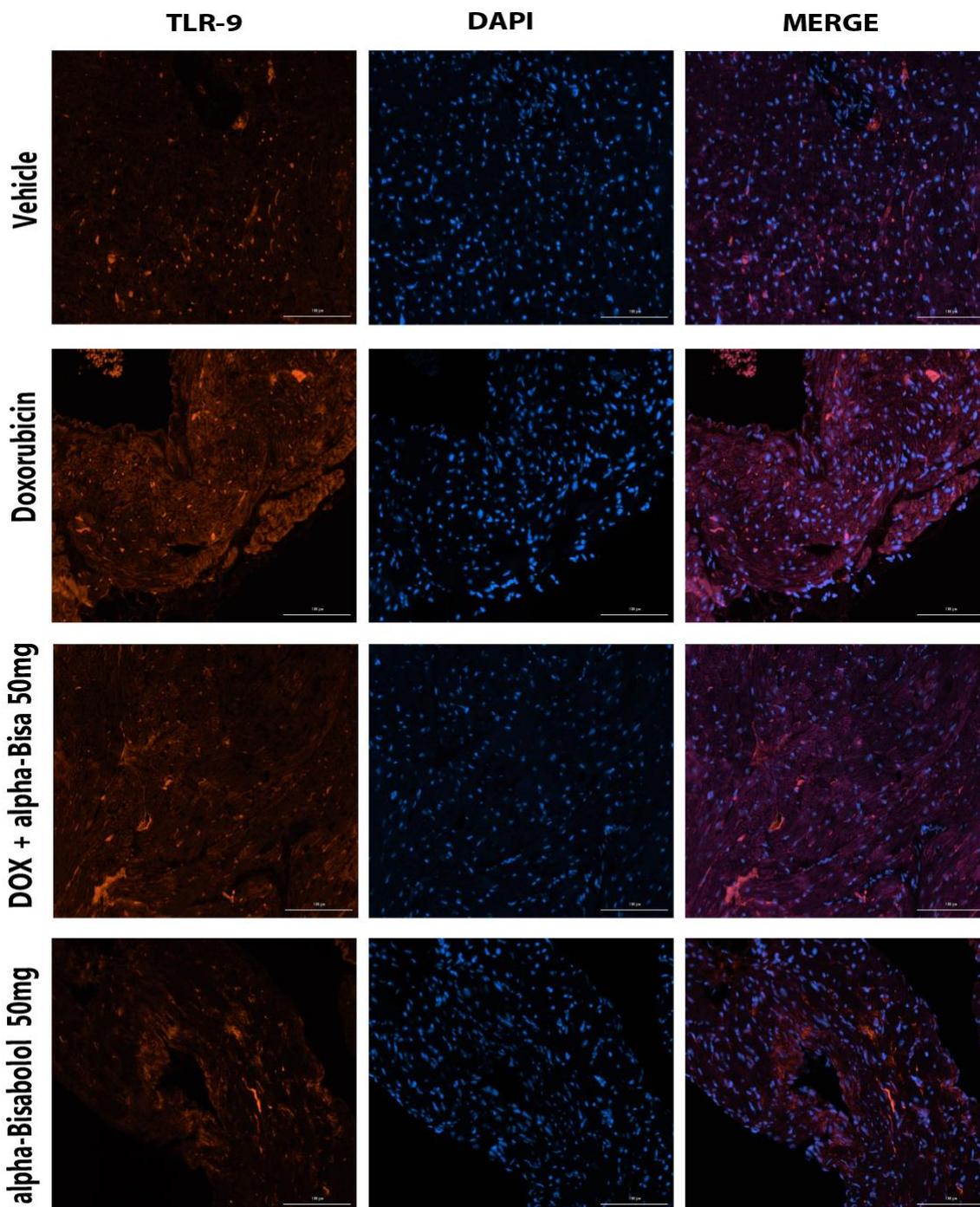
Os animais foram divididos em grupo controle (Salina 0,9% 5,60 ml/kg + tween 20 2% i.p 1xdia/19 dias), doxorubicina (4 mg/kg dias 0, 7 e 14) isoladamente ou associado ao alfa-bisabolol (50 mg/kg 1xdia/19 dias) ou alfa-bisabolol isoladamente por 19 dias. A doxorubicina induz (A) um aumento sérico de CK-MB e (B) acúmulo de neutrófilos no tecido cardíaco. Esses achados são inibidos pelo alfa-bisabolol (painéis A e B). Os valores são expressos como média ± E.P.M sendo consideradas estatisticamente significativas quando o valor de $P < 0,05$.

Figura 12- Expressão de TLR-9 em camundongos submetidos à cardiotoxicidade por doxorubicina e efeito do α -bisabolol sobre a expressão deste receptor.



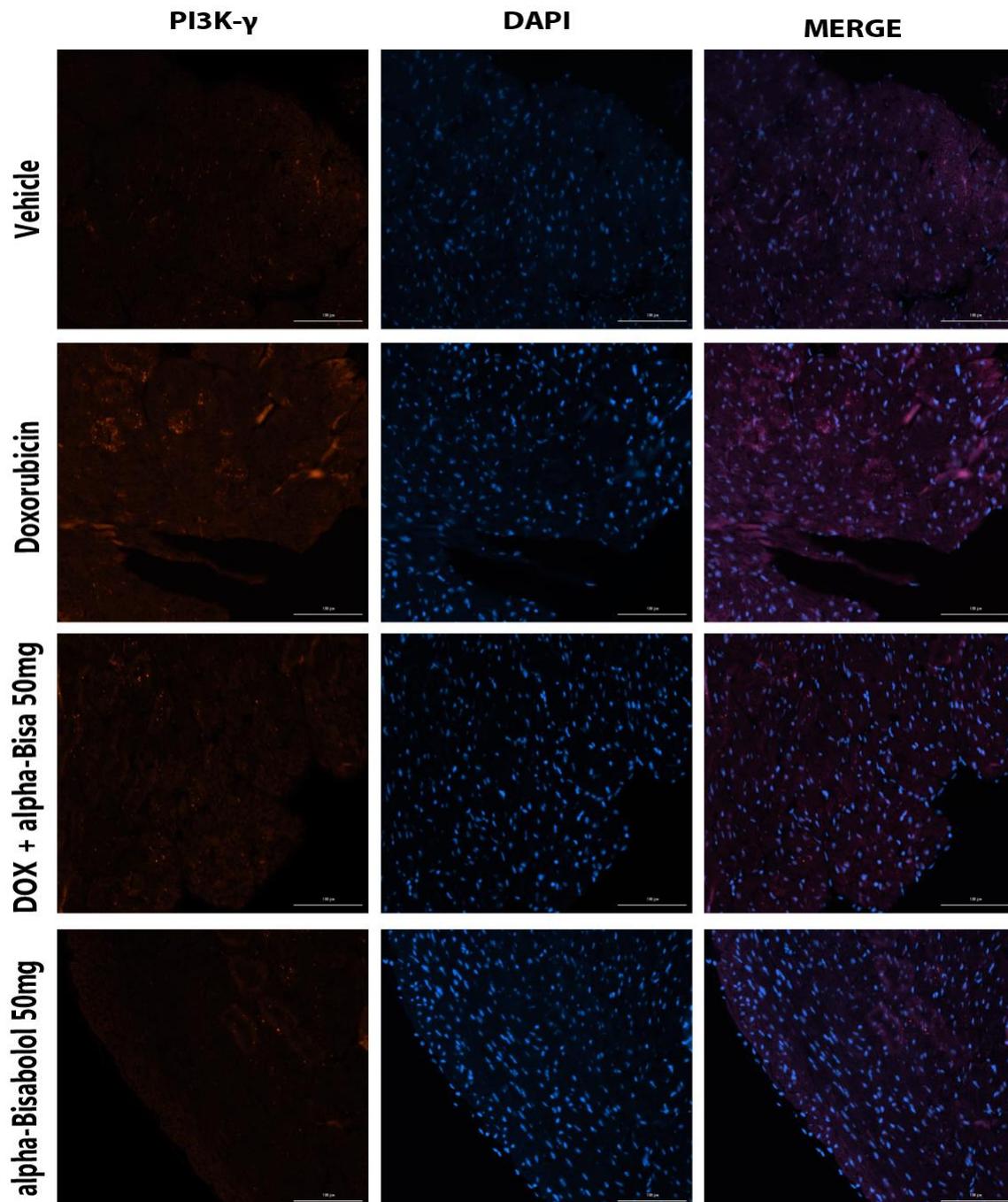
O tecido cardíaco foi coletado no dia experimental 20 e colocado em formol tamponado para posterior confecção de blocos de parafina. Os cortes foram feitos em seções de 3 μ m em lâmina silanizada para verificação da expressão de TLR9 por imunohistoquímica. (A) Imagens representativas do efeito do α -bisabolol sobre a expressão do TLR-9. Aumento: 200 \times . Escala: 50 μ m. (B) Quantificação do número de células marcadas para TLR9, indicando a capacidade da doxorubicina em aumentar a expressão desse receptor e do α -bisabolol em prevenir tal efeito. Os valores são expressos como média \pm E.P.M, sendo consideradas estatisticamente significativas quando o valor de $P < 0,05$.

Figura 13- Expressão de TLR-9 em camundongos submetidos à cardiotoxicidade por doxorubicina e efeito preventivo do alfa-bisabolol sobre essa expressão.



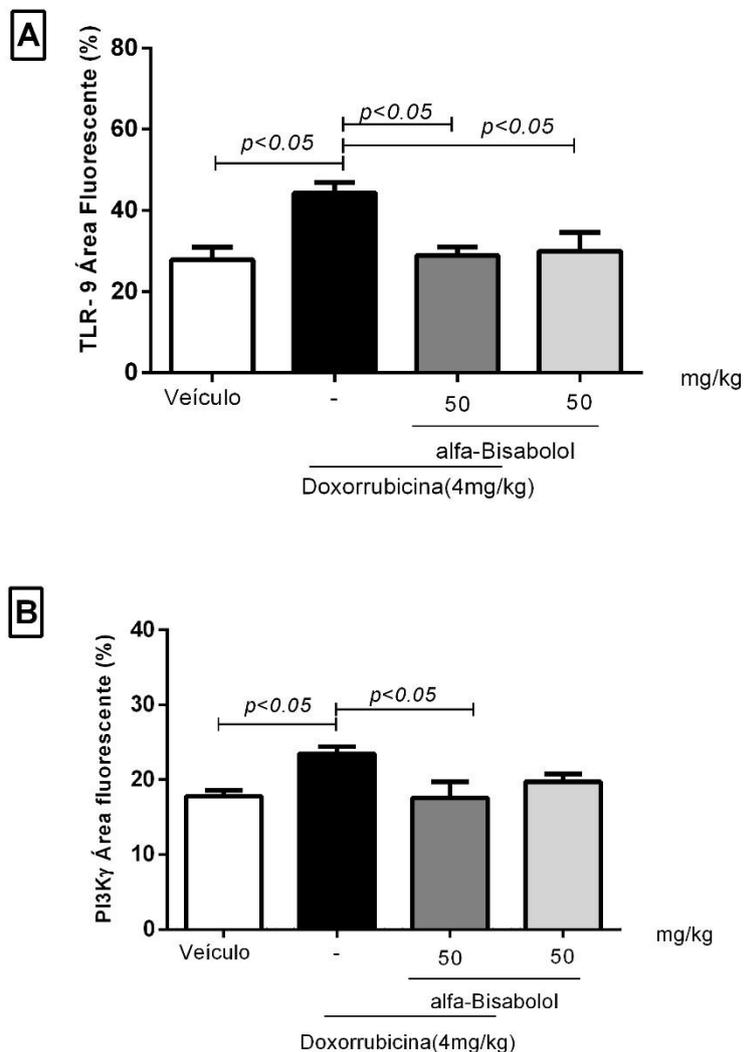
O tecido cardíaco foi coletado no dia 20 e disposto em formol tamponado para posterior confecção dos blocos de parafina e secção de 3 μm para a realização do ensaio de imunofluorescência. Fluorescência vermelha representa o TLR-9 (Donkey-anti-mouse IGg, vermelho, 568), azul DAPI (marcador nuclear). Aumento: 200 \times . Escala: 100 μm .

Figura 14- Expressão de PI3K- γ em tecido cardíaco de animais submetidos à cardiotoxicidade por doxorubicina e efeito protetor do α -bisabolol.



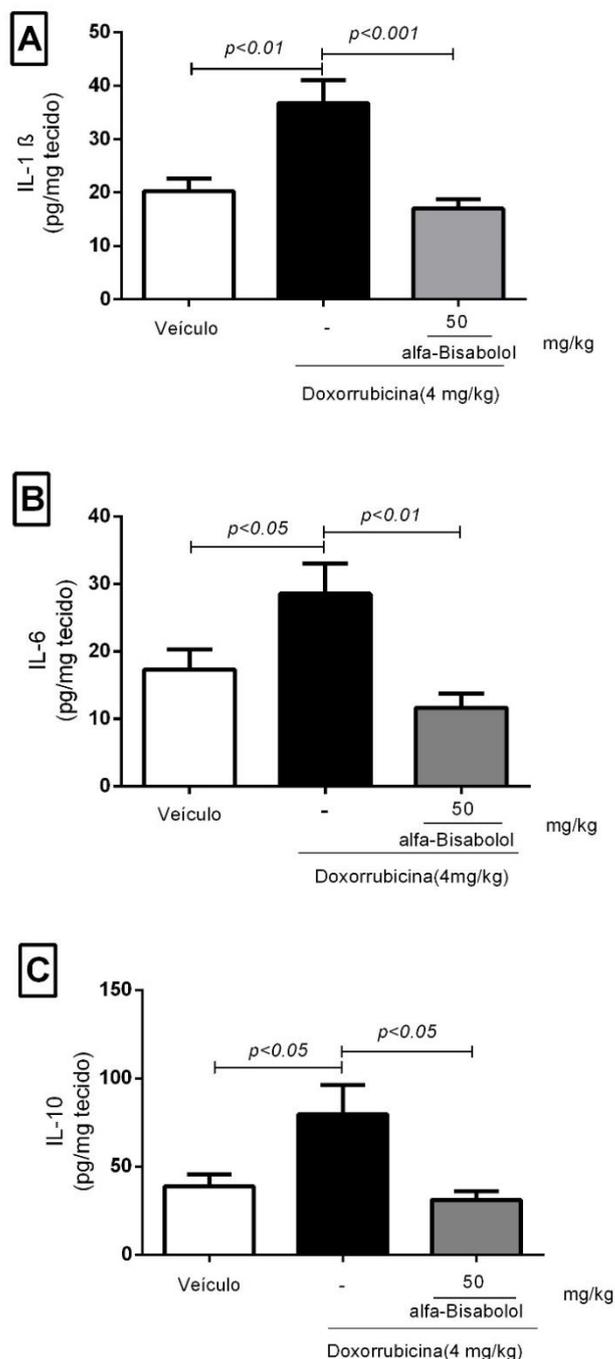
O tecido cardíaco foi coletado no dia 20 e disposto em formol tamponado para posterior confecção dos blocos de parafina e secção de 3 μ m para a realização do ensaio de imunofluorescência. Fluorescência vermelha representa o PI3K- γ (Donkey-anti-mouse IGg, vermelho, 568), azul DAPI (marcador nuclear). Aumento: 200 \times . Escala: 100 μ m.

Figura 15- Quantificação da área fluorescente relativamente à expressão de TLR-9 e PI3K- γ em coração de camundongos submetidos à cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina.



O tecido cardíaco foi coletado no dia 20 e disposto em formol tamponado para posterior confecção dos blocos de parafina e secção de 3 μ m para a realização do ensaio de imunofluorescência. Os gráficos representam a porcentagem da área fluorescente positiva para TLR9 ou PI3K- γ . Os valores são expressos como média \pm E.P.M sendo consideradas estatisticamente significativas quando o valor de $P < 0,05$.

Figura 16- Efeito do alfa-bisabolol sobre os níveis cardíacos de citocinas em animais submetidos à cardiotoxicidade associada à doxorrubicina.



Níveis de citocina IL-1beta, IL-6 e IL-10 em tecido cardíaco. Os animais foram divididos em grupo controle (Salina 0,9% 5,60 ml/kg + tween 20 2% i.p 1xdia/19 dias), doxorrubicina (4 mg/kg dias 0, 7 e 14) isoladamente ou associado ao alfa-bisabolol (50 mg/kg 1xdia/19 dias) ou alfa-bisabolol isoladamente por 19 dias. A doxorrubicina aumenta os níveis de (A) IL-1B, (B) IL-6 e (C) IL-10, o que é reduzido pelo tratamento dos animais com alfa-bisabolol. Os valores são expressos como média \pm E.P.M sendo consideradas estatisticamente significativas quando o valor de $P < 0,05$

7. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi avaliado o potencial efeito do alfa-bisabolol em modular a cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina em modelo experimental usando camundongos da linhagem C57BL/6. Os resultados deste trabalho mostraram uma melhora das alterações histopatológicas, eletrocardiográficas e inflamatórias em animais tratados com o sesquiterpeno alfa-bisabolol.

Embora os mecanismos celulares e moleculares da cardiomiopatia induzida pela doxorubicina ainda não tenham sido completamente esclarecidos, estudos prévios demonstraram que a cardiotoxicidade é mediada pela inibição da Top2 α/β em cardiomiócitos, levando à quebra da fita dupla do DNA e alterações no transcriptoma. Tais efeitos são os responsáveis da disfunção mitocondrial e geração de EROS e desregulação do cálcio (ZHANG et al., 2012)(OCTAVIA et al., 2012). Além disso, a formação do complexo Dox-Fe³⁺ é outro mecanismo descrito que leva a um aumento de ROS, com o subsequente desenvolvimento de cardiotoxicidade (PODYACHEVA et al., 2021).

Nas tentativas iniciais de estabelecer modelos de cardiomiopatia para investigar os mecanismos envolvidos na patogênese da cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina, utilizou-se, predominantemente, a administração do quimioterápico por via intravenosa, através da veia cauda (FORSSSEN; TOKES, 1981)(KANTER et al., 1985). Essa abordagem visava a reproduzir a via de administração classicamente empregada em contextos clínicos. Assim também, a via intraperitoneal foi testada e aceita na prática, sendo atualmente bastante utilizada (JOHANSEN, 1981)(MOSTAFA et al., 2000). Devido ao sucesso observado para essa via, optamos por empregá-la em nosso estudo.

No nosso trabalho, a indução da cardiotoxicidade foi realizada de acordo com os protocolos utilizados no estudo de Zhao et al., (2010). Eles trabalharam com um modelo de cardiotoxicidade induzido com uma dose 4 mg/kg de doxorubicina aplicada por via intraperitoneal por três semanas, com um total de 3 doses e representando uma dose cumulativa de 12 mg/kg, dose que não compromete a sobrevivência dos camundongos e que eficientemente induz a cardiotoxicidade. Outros modelos de cardiotoxicidade aguda demonstraram que uma dose única de 30 mg/kg tem um impacto alto na redução da sobrevivência dos animais, enquanto que doses de 15 – 20mg/kg demonstraram afetar menos

a sobrevivência dos camundongos, sendo, assim, o perfil de doses mais utilizado em modelos agudos (MA et al., 2020) (MIZUTA et al., 2020).

Como mencionado anteriormente, observa-se na prática clínica que para pacientes oncológicos uma dose cumulativa de 400–450 mg/m² é muito associada ao desenvolvimento de cardiotoxicidade (VON HOFF et al., 1979) (SHEIBANI et al., 2022). Esta dose de pacientes equivale a 12 mg/kg em camundongos, uma dose ainda um pouco maior para garantir que o 100% dos camundongos desenvolveriam a cardiotoxicidade, por esta razão foi utilizada tal dose.

Atualmente, o único fármaco aprovado pela agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) para reduzir a lesão miocárdica induzida por doxorubicina é o agente cardioprotetor dexrazoxano, um quelante de ferro (ICHIKAWA et al., 2014). O dexrazoxano melhora a cardiotoxicidade induzida pelas antracilinas ao se ligar ao ferro livre, diminuindo assim a formação de complexos antraciclina-ferro e, dessa forma, a produção de EROS na mitocôndria que são prejudiciais ao tecido cardíaco. Além disso, descobriu-se que produz proteção ao atenuar apoptose e necroptose através da interferência nas vias p38MAPK/NF-κB (YU et al., 2020). Contudo, muitos efeitos colaterais estão associados ao uso desse cardioprotetor, como o aumento do risco de leucemia mieloide aguda e síndromes mielodisplásicas (TEBBI et al., 2007). Nesse sentido, a busca por novos agentes cardioprotetores é fundamental visando abrirem-se perspectivas de manutenção dos regimes de doses dos pacientes oncológicos.

Compostos têm sido testados, porém apresentando resultados variáveis (KOSS-MIKOŁAJCZYK et al., 2021). Uma classe candidata e com potencial terapêutico é a dos terpenos (DENG; HUANG; WU, 2021) (DENG; HUANG; WU, 2021). Um estudo conduzido por Nagoor meeran et al., (2018) evidenciou que o sesquiterpeno alfa-bisabolol (25mg/kg) administrado por 10 dias, foi capaz de inibir as sequelas do infarto de miocárdio induzido por isoproterenol ao inibir a disfunção mitocondrial e a via intrínseca de apoptose em ratos. Outros achados experimentais em outro estudo utilizando o mesmo modelo de infarto de miocárdio, incluíram uma melhora das anormalidades morfológicas, além de o alfa-bisabolol ser capaz de atenuar o estresse oxidativo e a inflamação ao inibir o inflamassoma NLRP3 e as vias de sinalização TLR4-NFκB/MAPK e reduzir a disfunção lisossomal (NAGOOR MEERAN et al., 2020). Com isso, o mecanismo farmacológico e molecular subjacente à cardioproteção mediada pelo alfa-

bisabolol foi atribuído a suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (NAGOOR MEERAN et al., 2020).

Baseado na capacidade do alfa-bisabolol em modular estresse oxidativo e inflamação em doses de 25 mg/kg nesses modelos mencionados anteriormente e, em modelos de sepse induzida por ligadura e punção cecal (CLP) em dose de 50, 100, 200 mg/kg (CAVALCANTE et al., 2020), no presente estudo, foram testadas doses de 5 mg/kg, 10 mg/kg e 50 mg/kg. De forma consistente, a dose de 50 mg/kg de alfa-bisabolol apresentou-se como a mais efetiva em melhorar alterações histopatológicas, sendo, por conseguinte, a dose utilizada para avaliar o impacto sobre parâmetros morfológicos e inflamatórios.

O surfactante tween 80 foi utilizado para dissolver o alfa-bisabolol. É comumente utilizado em muitas preparações farmacológicas. Contudo, alguns estudos em cães relataram efeito hipotensor dependente da dose via intravenosa (PICKOFF; SINGH; PICKOFF, 1984). No caso de estudos em camundongos, mostraram baixa toxicidade oral ou intraperitoneal, recomendando-se que o tensoativo pode ser empregado com segurança em doses não superiores a 1 ml/kg (R K VARMA, 1985). No caso do nosso trabalho foi empregada uma dose muito baixa de apenas 2%.

Normalmente os pacientes submetidos à quimioterapia têm um alto risco de perda de peso devido à desnutrição e caquexia secundária à doença ou tratamento. Estima-se que entre 40–80% dos pacientes com câncer sofrem com diferentes graus de desnutrição que aumentam o risco de infecção, custo de saúde e afetam a qualidade de vida (SÁNCHEZ-LARA et al., 2013). Nossos resultados mostraram uma significativa perda de massa corpórea nos camundongos expostos ao quimioterápico doxorrubicina, além de uma redução do índice cardíaco, tal como evidenciado em outros estudos (MA et al., 2020)(LI et al., 2018). De forma marcante, o tratamento dos animais com alfa-bisabolol atenuou esses parâmetros. LI e colaboradores, (2018) demonstraram, no mesmo modelo experimental do presente estudo, algumas alterações morfológicas como uma diminuição da área do cardiomiócito. Tais achados foram adequadamente reproduzidos no nosso trabalho. A evidência aqui apresentada de que o alfa-bisabolol preveniu tais alterações, reforça o benefício deste terpeno em atenuar as alterações de massa corpórea e de índice cardíaco.

Estudos em pacientes adultos sugeriram que as antraciclina causam várias anormalidades cardiovasculares. A queixa de falta de ar aos esforços e dor torácica, os

achados de edema nas pernas e ganho de peso são exemplos de alterações sugestivas de cardiotoxicidade (KUBOTA; HARA; HIROI, 2021). Outros estudos relataram que os efeitos cardiotóxicos da doxorubicina afetam tanto a condutividade como a ritmicidade do músculo cardíaco (MUSTAFA et al., 2017). Alterações são verificadas no ECG, incluindo inversão da onda T, elevação ou depressão do segmento ST, diminuição da voltagem do complexo QRS, prolongamento do intervalo QT e arritmias, incluindo arritmias supraventriculares e ventriculares (KILICKAP et al., 2005). O exame físico diário cuidadoso também é importante para a detecção precoce desses sinais de manifestação da cardiotoxicidade.

A forma do potencial de ação ventricular entre humanos e camundongos pode resultar em algumas diferenças importantes na morfologia do ECG, a diferença mais proeminente é a presença de uma onda J no final do complexo QRS e a ausência de um segmento ST isoeletrico em camundongos (BOUKENS et al., 2013). De forma interessante, essa onda J também poderiam se apresentar em traçados em humanos devido a complicações como hipotermia, repolarização precoce, doença dos canais iônicos como a síndrome de Brugada (MERENTIE; LOTTONEN-RAIKASLEHTO; YLÄ-HERTTUALA, 2018).

No nosso trabalho, a análise do ECG mostrou um prolongamento do intervalo QT, R-R e complexo QRS. A duração QRS prolongada provavelmente poderia estar associada à disfunção do VE e alterações patológicas incluindo infarto agudo do miocárdio (IAM) (KARAHAN et al., 2016). De forma interessante, essas alterações na condução e atenuação da função ventricular esquerda são mudanças já relatadas em outros estudos em camundongos (CH; JAGETIA; VENKATESH, 2015)(WARHOL et al., 2021) e também em ratos (SALEH et al., 2020)(HEKMAT et al., 2021). Além disso, a diminuição da onda T correlaciona-se com o desenvolvimento de cardiotoxicidade induzido pela doxorubicina (DANESI; DEL TACCA; SOLDANI, 1986). De forma consistente, o alfa-bisabolol conseguiu modular essas alterações, em quase todos os parâmetros. Por outro lado, no caso da altura T, o sesquiterpeno mostrou uma diminuição ainda menor que a observada no grupo injetado com a doxorubicina, além disso, nossos resultados apontaram para bradicardia significativa no grupo alfa-bisabolol em comparação ao grupo controle.

Inclusive nossos resultados também mostraram uma progressão pobre na amplitude da onda R pelas siglas em inglês (PRWP). Há anos autores relataram que a progressão pobre da onda R pode ser causa de (IAM), hipertrofia ventricular esquerda,

hipertrofia ventricular direita tipo C ou pode ocorrer em sujeitos normais (ZEMA; KLIGFIELD, 1979), porém outro estudo mostrou que não é um parâmetro preditivo positivo para o diagnóstico de IAM (ZEMA, 2010). De forma interessante, outros autores relatam que existe uma correlação direta entre a amplitude da onda R e o tamanho da massa do ventrículo esquerdo (FELDMAN et al., 1985), esses achados apoiam a hipótese de um estudo mais recente que mostrou que um índice cardiotorácico mais baixo está associado a PRWP (KIM et al., 2009).

A bradicardia, muito provavelmente, pode estar associada a um efeito de ativação do sistema vagal induzida pelo sesquiterpeno. Essa ativação normalmente afeta os nódulos sinusais e atrioventriculares e, no ECG, a ativação resulta em manifestações que incluem desaceleração da frequência sinusal, parada sinusal e graus variados de bloqueios do nó AV (SUGGS; TONNESSEN; PAVRI, 2020).

Embora seja mais preferível a leitura do ECG em camundongos conscientes para melhorar a qualidade e aumentar a quantidade dos dados, o manuseio e movimentação dos animais dificultam o uso da técnica. No presente trabalho, realizaram-se as mensurações em camundongo anestesiado, selecionando o anestésico que potencialmente acarretaria menos efeitos cardiovasculares, gerando medidas mais estáveis e reprodutíveis. Utilizou-se, portanto, a mistura quetamina/xilazina durante a leitura do ECG. Algumas das alterações decorrentes do uso desse anestésico são bradicardia e hipotensão (ROTH et al., 2002). Contudo, por termos uma resposta de referência do grupo controle, dose, tempo de experimento que foram análogos em todos os grupos experimentais, esses interferentes são dissipados quando da análise.

O alfa-bisabolol tem gerado considerável interesse por sua propriedade anti-inflamatória demonstrada em modelos experimentais diversos. Maurya et al., (2014) avaliaram o perfil terapêutico do alfa-bisabolol *in vitro*, indicando que este sesquiterpeno diminui a capacidade de macrófagos estimulados por lipopolissacarídeo (LPS) e 12-o-tetradecanol-forbol-13-acetato (TPA) em produzir citocinas pró-inflamatórias (TNF-alfa e IL-6).

O potencial anti-inflamatório do alfa-bisabolol também foi explorado *in vivo* em modelos de inflamação da pele induzida por TPA em camundongos (MAURYA et al., 2014), em modelos de edema de pata induzido por carragenina ou dextrano e de contorção abdominal induzida por ácido acético (ROCHA et al., 2011)(DE O. LEITE et al., 2011).

A referida atividade anti-inflamatória foi, também, testada em um modelo de sepse induzida por ligadura e punção cecal (CLP), indicando que o alfa-bisabolol (100 mg/kg) reduz o recrutamento de leucócitos para a cavidade peritoneal e a taxa de mortalidade dos animais (KIM et al., 2011)(CAVALCANTE et al., 2020).

Outros achados também mostraram que o alfa-bisabolol interfere na via de NO, via que está envolvida no desenvolvimento de cardiotoxicidade induzida por doxorrubicina. Foi relatado que o sesquiterpeno induz inibição da produção da iNOS e COX2 durante a inflamação induzida por LPS em Células RAW264.7 (EGBUTA et al., 2022). Observou-se, ainda, que a exclusão de eNOS melhora a função cardíaca em camundongos (NEILAN et al., 2007).

Siqueira e colaboradores no 2012 levantaram a hipótese de que o alfa-bisabolol pode atuar como um inibidor de canais de cálcio dependentes de voltagem. Posteriormente, o mesmo grupo evidenciou que o alfa-bisabolol causa vasorrelaxamento em artérias isoladas de rato pela inibição de canais de cálcio dependentes de voltagem (DE SIQUEIRA et al., 2014).

Do mesmo modo, a modulação do cálcio em mecanismos antinociceptivo e anti-inflamatório pelo alfa-bisabolol foi indicada estar envolvida nos modelos pré-clínicos de dor crônica induzida pelo adjuvante completo de Freud (ACF) ou lesão parcial do nervo ciático (PLSN). Outro estudo mostrou a redução da glicose e inflamação crônica por um mecanismo que envolve a diminuição da expressão de IBA-1, uma proteína adaptadora de ligação ao cálcio ionizado (FONTINELE et al., 2019). Todas essas evidências nos levaram a crer no potencial protetor do alfa-bisabolol sobre a cardiotoxicidade associada à doxorrubicina, visto que muitos desses mecanismos são compartilhados quando da manifestação dessa toxicidade.

Muitos estudos têm demonstrado que a doxorrubicina ativa vários mecanismos moleculares e vias de sinalização cursando com estresse oxidativo, inflamação e apoptose, culminando com a lesão cardíaca (ZHANG et al., 2020)(CHENG et al., 2020)(LI et al., 2018)(KOLEINI; KARDAMI, 2017)(KHAFAGA; EL-SAYED, 2018)(BIN JARDAN et al., 2020; BIRARI et al., 2020; TIMM; TYLER, 2020).

Os papéis da inflamação sistêmica, lesão endotelial e recrutamento de neutrófilos, todos induzidos pela doxorrubicina, são cada vez mais reconhecidos como os mecanismos que desencadeiam o desenvolvimento e progressão da cardiomiopatia induzida pela doxorrubicina (TODOROVA; WEI; MAKHOUL, 2021). Corroborando tais achados,

nosso estudo demonstrou que a doxorrubicina induz acúmulo de neutrófilos no tecido cardíaco e que o alfa-bisabolol suprime de forma significativa a resposta inflamatória ao diminuir a atividade da MPO.

Há fortes indícios de que a lesão de cardiomiócitos induzida por este quimioterápico é precedida por lesão endotelial vascular associada à degranulação de neutrófilos e liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos, NETs (do inglês, *neutrophil extracellular traps*). As características mais marcantes dos NETs são fitas de DNA ligadas com pró-interleucina-1 α (pró-IL-1 α) que podem ativar células endoteliais e produzir mais citocinas inflamatórias (CHENG; CONTRERAS; YEH, 2022). Os NETs também são compostos de muitos componentes de proteínas/enzimas e produtos químicos, como mieloperoxidase, elastase de neutrófilos, fatores teciduais que podem ativar o Fator VII para iniciar a trombose e ácido hipocloroso (HOCl), uma espécie altamente pró-oxidante (CHENG; CONTRERAS; YEH, 2022). Em pacientes com câncer de mama recebendo quimioterapia à base de doxorrubicina, os altos níveis plasmáticos de NETs foram associados à cardiotoxicidade relacionada à doxorrubicina (TODOROVA; PENNISI; MAKHOUL, 2018). Assim, não sabemos se o alfa-bisabolol inibiu a migração direta de neutrófilos para o tecido lesado ou se este inibiu os mecanismos lesivos derivados da presença do próprio neutrófilo, o que ainda carece de mais investigações.

As consequências da presença de neutrófilos durante o desenvolvimento da cardiotoxicidade muito provavelmente leva à liberação de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) que deflagram uma sinalização celular essencial nesse processo. As proteínas granulares de neutrófilos participam da ruptura da estrutura da matriz extracelular, levando à inflamação endotelial, amplificando a transmigração de neutrófilos e apoptose. NETs fornecem suporte para todo esse mecanismo de ativação e deposição de plaquetas, promovendo assim a formação de trombose (TODOROVA; WEI; MAKHOUL, 2021). Em paralelo, a doxorrubicina se acumula na mitocôndria por esta apresentar topoisomerase II α/β (TopII α/β) (WALLACE; SARDÃO; OLIVEIRA, 2020), atenuando a defesa antioxidante das células, via a redução da atividade de superóxido dismutase (SOD) e o conteúdo ou atividade da catalase, prolongando o dano mitocondrial (TODOROVA; WEI; MAKHOUL, 2021). Tal mecanismo é percebido pelas células via receptores de reconhecimento de padrões moleculares, como o TLR-9, que reconhece a mitocôndria lesada (LI et al., 2018). Meeram e colaboradores no 2018

mostraram que o alfa-bisabolol promove atividade antioxidante ao reduzir a peroxidação lipídica. Também relataram que o alfa-bisabolol apresenta atividade protetora ao reduzir significativamente atividades elevadas da CK sérica e CK-MB em ratos tratados com isoproterenol, achados reproduzidos em nosso estudo.

Estudos prévios, em condições *in vivo* e *in vitro*, demonstraram que a cardiotoxicidade induzida por doxorubicina é atenuada pela deficiência de TLR-9, verificando-se uma melhora na função cardíaca e redução da apoptose, estresse oxidativo e regulação dos mecanismos autofágicos anormais (GUO et al., 2020)(GHIGO; LI; HIRSCH, 2016). Outros estudos relataram o efeito benéfico da inibição da fosfoinositol-3-quinase gamma (PI3K γ) em algumas doenças cardiovasculares com um componente inflamatório (DAMILANO et al., 2011) (CARNEVALE et al., 2012).

Além disso, dados consistentes obtidos *in vitro*, *in vivo* e em biópsias cardíacas de pacientes oncológicos expostos à doxorubicina indicam que a ativação do PI3K γ é mediada pelo TLR-9 (LI et al., 2018). Nos cardiomiócitos, a doxorubicina lesa a mitocôndria, liberando o DNA mitocondrial, o qual ativa a sinalização PI3K γ *downstream* ao receptor TLR-9. Tal mecanismo inibe a autofagia e gera reprogramação metabólica com formação de EROS, o que leva à morte dos cardiomiócitos (LI et al., 2018). Esses achados põem o TLR-9 e a PI3K γ como sinalizadores cruciais na gênese da cardiotoxicidade, visto que a modulação genética ou farmacológica desses alvos previne o estabelecimento deste efeito colateral (LI et al., 2018). Nossos resultados indicaram uma expressão aumentada tanto de TLR9, como de PI3K γ . Muito provavelmente, o efeito protetor mediado pelo alfa-bisabolol foi devido, em parte, à inibição desta expressão.

A insuficiência cardíaca congestiva é uma condição consequente ao dano gerado pela doxorubicina (SHEIBANI et al., 2022). Evidências crescentes suportam a relação entre a inflamação e a patogênese da insuficiência cardíaca consequente à exposição a este quimioterápico. Como mencionado anteriormente, a sinalização da PI3K tem papel crucial, contribuindo para a lesão de isquemia/reperfusão do miocárdio e infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca, hipertrofia cardíaca, cardiomiopatia e lesão cardíaca (GHAFOURI-FARD et al., 2022). Há relatos de que a doxorubicina induz apoptose celular com o consequente influxo de neutrófilos e a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e IL-6, um processo envolvendo a sinalização de TLR-9 (KRYSKO et al., 2011). Os dados aqui apresentados corroboram tais observações, visto que se verificaram aumentos consistentes de citocinas pro-inflamatórias IL-1 β e IL-6 e,

em paralelo, houve um aumento concomitante da citocina anti-inflamatória IL-10, todos reduzidos pela administração de alfa-bisabolol.

O papel pleiotrópico que o mediador anti-inflamatório IL-10 desempenha durante a resposta imune é motivo de debate. Esta citocina pode, em alguns casos, limitar o dano tecidual (GUPTA et al., 2020), um típico efeito anti-inflamatório, mas em outros contribuir para a lesão tecidual, exatamente por limitar a extensão da resposta inflamatória protetora (NASCIMENTO et al., 2017). Porém; esses efeitos contraditórios dependem do tipo tecido envolvido e do tipo de doença (SARAIVA; VIEIRA; O’GARRA, 2020).

No contexto do presente estudo, o fato de a cardiotoxicidade cursar com um aumento dos níveis de IL-10 em paralelo ao aumento de citocinas pró-inflamatórias, pode ser explicado como uma resposta homeostática de se restringir a extensão do dano mediado pela quimioterapia, o que é, per se, limitado até certo ponto.

Assim, o presente estudo pós luz ao potencial do sesquiterpeno, alfa-bisabolol, como alternativa para o manejo da cardiotoxicidade consequente à quimioterapia. O exato mecanismo de proteção ainda não está claro. Contudo, a modulação da acumulação de células inflamatórias, como os neutrófilos, prevenindo a ativação da via TLR-9/PI3K γ /IL-1 e IL-6, parece uma plausível explicação para a redução da lesão cardíaca.

8. CONCLUSÃO

O alfa-bisabolol previne a cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina em camundongos por inibir a acumulação de neutrófilos, por reduzir a expressão de TLR9 e PI3K γ , e por modular os efeitos prejudiciais da sinalização que levam a cardiotoxicidade manifestada por alterações morfológicas e bioquímicas.

9. REFERÊNCIAS

ALVES-FILHO, J. C. et al. Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 34, n. 2, p. 461–470, 2006.

- ARUNACHALAM, S. et al. Nerolidol Attenuates Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis by Modulating Nrf2/MAPK Signaling Pathways in Doxorubicin-Induced Acute Cardiotoxicity in Rats. **Antioxidants**, v. 10, n. 6, 1 jun. 2021.
- BIN JARDAN, Y. A. et al. Sinapic Acid Ameliorates Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis in Acute Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity via the NF- κ B-Mediated Pathway. **BioMed Research International**, v. 2020, 2020.
- BIRARI, L. et al. Aloin alleviates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats by abrogating oxidative stress and pro-inflammatory cytokines. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 86, n. 3, p. 419–426, 1 set. 2020.
- BRUNKE, E.-J.; HAMMERSCHMIDT, F.-J. Constituents of the Essential Oil of *Salvia Stenophylla* — First Identification of (+)-Epi- α -Bisabolol in Nature. **Essential Oils and Aromatic Plants**, p. 145–150, 1985.
- CARDINALE, D. et al. Early detection of anthracycline cardiotoxicity and improvement with heart failure therapy. **Circulation**, v. 131, n. 22, p. 1981–1988, 2 jun. 2015.
- CARNEVALE, D. et al. PI3K γ inhibition reduces blood pressure by a vasorelaxant Akt/L-type calcium channel mechanism. **Cardiovascular Research**, v. 93, n. 1, p. 200–209, 1 jan. 2012.
- CARON, J.; NOHRIA, A. **Cardiac Toxicity from Breast Cancer Treatment: Can We Avoid This?** **Current Oncology Reports** Current Medicine Group LLC 1, , 1 ago. 2018.
- CAVALCANTE, H. A. O. et al. Effect of (-)- α -Bisabolol on the Inflammatory Response in Systemic Infection Experimental Model in C57BL/6 Mice. **Inflammation**, v. 43, n. 1, p. 193–203, 1 fev. 2020.
- CH, G.; JAGETIA, RA; VENKATESH, P. An Indigenous Plant Bael (*Aegle Marmelos* (L.) Correa) Extract Protects Against the Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Mice. **Biochemistry & Physiology: Open Access 2015 4:3**, v. 4, n. 3, p. 1–10, 20 maio 2015.
- CHENG, K. H.; CONTRERAS, G. P.; YEH, T. Y. Potential Role of Neutrophil Extracellular Traps in Cardio-Oncology. **International Journal of Molecular Sciences 2022, Vol. 23, Page 3573**, v. 23, n. 7, p. 3573, 25 mar. 2022.
- CHENG, X. et al. Orosomucoid 1 Attenuates Doxorubicin-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in Cardiomyocytes via Nrf2 Signaling. **BioMed Research International**, v. 2020, 2020.
- DAMILANO, F. et al. Distinct effects of leukocyte and cardiac phosphoinositide 3-kinase γ activity in pressure overload-induced cardiac failure. **Circulation**, v. 123, n. 4, p. 391–399, 1 fev. 2011.
- DANESI, R.; DEL TACCA, M.; SOLDANI, G. Measurement of the S alpha T segment as the most reliable electrocardiogram parameter for the assessment of adriamycin-induced cardiotoxicity in the rat. **Journal of pharmacological methods**, v. 16, n. 3, p. 251–259, 1986.
- DE O. LEITE, G. et al. (-)- α -Bisabolol attenuates visceral nociception and inflammation in mice. **Fitoterapia**, v. 82, n. 2, p. 208–211, 1 mar. 2011.
- DE SIQUEIRA, R. J. B. et al. (-)- α -Bisabolol inhibits preferentially electromechanical coupling on rat isolated arteries. **Vascular Pharmacology**, v. 63, p. 37–45, 2014a.
- DE SIQUEIRA, R. J. B. et al. (-)- α -Bisabolol inhibits preferentially electromechanical coupling on rat isolated arteries. **Vascular pharmacology**, v. 63, n. 1, p. 37–45, 1 out. 2014b.
- DENG, J.; HUANG, M.; WU, H. Protective effect of limonin against doxorubicin-induced cardiotoxicity via activating nuclear factor - like 2 and Sirtuin 2 signaling pathways. **Bioengineered**, v. 12, n. 1, p. 7975–7984, 2021.

- EGBUTA, M. A. et al. In Vitro Anti-Inflammatory Activity of Essential Oil and β -Bisabolol Derived from Cotton Gin Trash. **Molecules**, v. 27, n. 2, 1 jan. 2022.
- FONTINELE, L. L. et al. Anti-hyperalgesic effect of (-)- α -bisabolol and (-)- α -bisabolol/ β -Cyclodextrin complex in a chronic inflammatory pain model is associated with reduced reactive gliosis and cytokine modulation. **Neurochemistry international**, v. 131, 1 dez. 2019.
- FORSSEN, E. A.; TOKES, Z. A. Use of anionic liposomes for the reduction of chronic doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 3, p. 1873–1877, 1981.
- GHAFOURI-FARD, S. et al. Interplay between PI3K/AKT pathway and heart disorders. **Molecular biology reports**, 2 maio 2022.
- GHIGO, A.; LI, M.; HIRSCH, E. New signal transduction paradigms in anthracycline-induced cardiotoxicity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 7, p. 1916–1925, 1 jul. 2016.
- GUO, Z. et al. TLR9 deficiency alleviates doxorubicin-induced cardiotoxicity via the regulation of autophagy. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 24, n. 18, p. 10913–10923, 1 set. 2020.
- GUPTA, R. et al. IL-10 provides cardioprotection in diabetic myocardial infarction via upregulation of Heme clearance pathways. **JCI Insight**, v. 5, n. 17, 3 set. 2020.
- HEKMAT, A. S. et al. Alamandine significantly reduces doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. **Human and Experimental Toxicology**, v. 40, n. 10, p. 1781–1795, 1 out. 2021.
- HENRIKSEN, P. A. **Anthracycline cardiotoxicity: An update on mechanisms, monitoring and prevention** HeartBMJ Publishing Group, 1 jun. 2018.
- HERNÁNDEZ-CERUELOS, A. et al. Chemoprotection of fertility by chamomile essential oil over the toxic effect of. **Toxicology Letters**, v. 172, p. S185–S186, out. 2007.
- ICHIKAWA, Y. et al. Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation. **The Journal of clinical investigation**, v. 124, n. 2, p. 617–630, 3 fev. 2014.
- Incidência | INCA - Instituto Nacional de Câncer**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/controlado-cancer-de-mama/dados-e-numeros/incidencia>>. Acesso em: 19 mar. 2022.
- JAVED, H. et al. α -Bisabolol, a Dietary Bioactive Phytochemical Attenuates Dopaminergic Neurodegeneration through Modulation of Oxidative Stress, Neuroinflammation and Apoptosis in Rotenone- Induced Rat Model of Parkinson's disease. **Biomolecules**, v. 10, n. 10, p. 1–22, 1 out. 2020.
- JOHANSEN, P. B. Doxorubicin pharmacokinetics after intravenous and intraperitoneal administration in the nude mouse. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 5, n. 4, p. 267–270, 1981.
- KALIVENDI, S. V. et al. Doxorubicin activates nuclear factor of activated T-lymphocytes and Fas ligand transcription: role of mitochondrial reactive oxygen species and calcium. **Biochemical Journal**, v. 389, n. 2, p. 527–539, 15 jul. 2005.
- KAMATOU, G. P. P.; VILJOEN, A. M. A review of the application and pharmacological properties of α -bisabolol and α -bisabolol-rich oils. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87, n. 1, p. 1–7, jan. 2010.
- KANTER, M. M. et al. Effect of exercise training on antioxidant enzymes and cardiotoxicity of doxorubicin. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 59, n. 4, p. 1298–1303, 1985.

- KHAFAGA, A. F.; EL-SAYED, Y. S. All-trans-retinoic acid ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity: in vivo potential involvement of oxidative stress, inflammation, and apoptosis via caspase-3 and p53 down-expression. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 391, n. 1, p. 59–70, 1 jan. 2018.
- KILICKAP, S. et al. Doxorubicin-induced second degree and complete atrioventricular block. **Europace**, v. 7, n. 3, p. 227–230, 1 maio 2005.
- KIM, S. et al. Inhibitory effects of (–)- α -bisabolol on LPS-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 10, p. 2580–2585, 1 out. 2011.
- KOLEINI, N.; KARDAMI, E. Autophagy and mitophagy in the context of doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Oncotarget**, v. 8, n. 28, p. 46663–46680, 2017.
- KOSS-MIKOŁAJCZYK, I. et al. Natural Products Counteracting Cardiotoxicity during Cancer Chemotherapy: The Special Case of Doxorubicin, a Comprehensive Review. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 18, 1 set. 2021.
- KRYSKO, D. V. et al. TLR-2 and TLR-9 are sensors of apoptosis in a mouse model of doxorubicin-induced acute inflammation. **Cell Death & Differentiation** 2011 18:8, v. 18, n. 8, p. 1316–1325, 11 fev. 2011.
- KUBOTA, S.; HARA, H.; HIROI, Y. Current status and future perspectives of onco-cardiology: Importance of early detection and intervention for cardiotoxicity, and cardiovascular complication of novel cancer treatment. **Global health & medicine**, v. 3, n. 4, p. 214–225, 31 ago. 2021.
- LI, M. et al. Phosphoinositide 3-Kinase Gamma Inhibition Protects From Anthracycline Cardiotoxicity and Reduces Tumor Growth. **Circulation**, v. 138, n. 7, p. 696–711, 2018.
- MA, Z. G. et al. Toll-like receptor 5 deficiency diminishes doxorubicin-induced acute cardiotoxicity in mice. **Theranostics**, v. 10, n. 24, p. 11013–11025, 2020.
- MAURYA, A. et al. α -(-)-bisabolol reduces pro-inflammatory cytokine production and ameliorates skin inflammation. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 173–181, 30 set. 2014.
- MCGOWAN, J. V. et al. Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 31, n. 1, p. 63–75, 1 fev. 2017.
- MENEZES, I. A. C. et al. Hypotensive activity of terpenes found in essential oils. **Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences**, v. 65, n. 9–10, p. 562–566, 2010.
- MERENTIE, M.; LOTTONEN-RAIKASLEHTO, L.; YLÄ-HERTTUALA, S. Development and validation of ECG analysis algorithm in mice. **Conn's Handbook of Models for Human Aging**, p. 271–285, 1 jan. 2018.
- 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.
- MITRY, M. A.; EDWARDS, J. G. Doxorubicin induced heart failure: Phenotype and molecular mechanisms. **International journal of cardiology. Heart & vasculature**, v. 10, p. 17–24, 1 mar. 2016.
- MIZUTA, Y. et al. Sodium thiosulfate prevents doxorubicin-induced DNA damage and apoptosis in cardiomyocytes in mice. **Life sciences**, v. 257, 15 set. 2020.
- MOSTAFA, M. G. et al. S-allylcysteine ameliorates doxorubicin toxicity in the heart and liver in mice. **Planta medica**, v. 66, n. 2, p. 148–151, 2000.
- MUNOZ-PEREZ, V. M. et al. Anti-inflammatory and utero-relaxant effect of α -bisabolol on the pregnant human uterus. **The Korean journal of physiology & pharmacology :**

official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology, v. 22, n. 4, p. 391–398, 1 jul. 2018.

MUSTAFA, H. N. et al. Protective role of CoQ10 or L-carnitine on the integrity of the myocardium in doxorubicin induced toxicity. **Tissue and Cell**, v. 49, n. 3, p. 410–426, 1 jun. 2017.

NAGOOR MEERAN, M. F. et al. α -Bisabolol abrogates isoproterenol-induced myocardial infarction by inhibiting mitochondrial dysfunction and intrinsic pathway of apoptosis in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry** 2018 **453:1**, v. 453, n. 1, p. 89–102, 29 ago. 2018.

NAGOOR MEERAN, M. F. et al. **α -Bisabolol protects against β -adrenergic agonist-induced myocardial infarction in rats by attenuating inflammation, lysosomal dysfunction, NLRP3 inflammasome activation and modulating autophagic flux.** Food and Function. **Anais...Royal Society of Chemistry**, 1 jan. 2020.

NAJAFI, M. et al. **The role of melatonin on doxorubicin-induced cardiotoxicity: A systematic review** **Life Sciences** Elsevier Inc., 15 jan. 2020.

NARESH, N. K. et al. Cardiac MRI Myocardial Functional and Tissue Characterization Detects Early Cardiac Dysfunction in a Mouse Model of Chemotherapy-Induced Cardiotoxicity. **NMR in biomedicine**, v. 33, n. 9, 1 set. 2020.

NASCIMENTO, D. C. et al. IL-33 contributes to sepsis-induced long-term immunosuppression by expanding the regulatory T cell population. **Nature communications**, v. 8, 4 abr. 2017.

NEILAN, T. G. et al. Disruption of nitric oxide synthase 3 protects against the cardiac injury, dysfunction, and mortality induced by doxorubicin. **Circulation**, v. 116, n. 5, p. 506–514, 31 jul. 2007.

OCTAVIA, Y. et al. **Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies** **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, jun. 2012a.

OCTAVIA, Y. et al. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 52, n. 6, p. 1213–1225, jun. 2012b.

ORAV, A.; RAAL, A.; ARAK, E. Content and composition of the essential oil of Chamomilla recutita (L.) Rauschert from some European countries. **Natural product research**, v. 24, n. 1, p. 48–55, jan. 2010.

PECORARO, M. et al. Inflammatory mediators in a short-time mouse model of doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 293, p. 44–52, 15 fev. 2016.

PICKOFF, A. S.; SINGH, S.; PICKOFF, A. S. Electrophysiologic effects of Tween 80 in the myocardium and specialized conduction system of the canine heart. **Journal of electrocardiology**, v. 17, n. 2, p. 145–151, 1984.

PODYACHEVA, E. Y. et al. Analysis of models of doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats and mice. A modern view from the perspective of the pathophysiological and the clinician. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 1398, 2021.

R K VARMA, K. Y. J. P. T. **Polisorbato 80: um estudo farmacológico - PubMed**. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4026903/>>. Acesso em: 18 jun. 2022. **Registration Dossier - ECHA**. Disponível em: <<https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/20318/7/3/1>>. Acesso em: 6 jun. 2022.

ROCHA, N. F. M. et al. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of (-)- α -bisabolol in rodents. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 384, n. 6, p. 525–533, dez. 2011.

- ROTH, D. M. et al. Impact of anesthesia on cardiac function during echocardiography in mice. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 282, n. 6 51-6, 2002.
- SALEH, D. et al. Omega-3 fatty acids ameliorate doxorubicin-induced cardiorenal toxicity: In-vivo regulation of oxidative stress, apoptosis and renal Nox4, and in-vitro preservation of the cytotoxic efficacy. **PLOS ONE**, v. 15, n. 11, p. e0242175, 1 nov. 2020.
- SÁNCHEZ-LARA, K. et al. Gastrointestinal symptoms and weight loss in cancer patients receiving chemotherapy. **British Journal of Nutrition**, v. 109, n. 5, p. 894–897, 14 mar. 2013.
- SARAIVA, M.; VIEIRA, P.; O’GARRA, A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. **The Journal of experimental medicine**, v. 217, n. 1, 6 jan. 2020.
- SCHLAME, M.; RUA, D.; GREENBERG, M. L. The biosynthesis and functional role of cardiolipin. **Progress in lipid research**, v. 39, n. 3, p. 257–288, 1 maio 2000.
- SCHUMANN, G. et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. Part 2. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of creatine kinase. **Clinical chemistry and laboratory medicine**, v. 40, n. 6, p. 635–642, 2002.
- SHANMUGANATHAN, B. et al. Anti-amyloidogenic and anti-apoptotic effect of α -bisabolol against A β induced neurotoxicity in PC12 cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 1196–1207, 1 jan. 2018.
- SHEIBANI, M. et al. Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: An Overview on Pre-clinical Therapeutic Approaches. **Cardiovascular Toxicology**, v. 22, n. 4, p. 292–310, 1 abr. 2022.
- SIEGEL, R. L. et al. Cancer Statistics, 2021. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 1, p. 7–33, jan. 2021.
- SILVA, D. et al. Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: From Mechanisms to Development of Efficient Therapy. **Cardiotoxicity**, 5 nov. 2018.
- STOCKWELL, B. R. et al. Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. **Cell**, v. 171, n. 2, p. 273–285, 5 out. 2017.
- 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.
- TEBBI, C. K. et al. Dexrazoxane-associated risk for acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome and other secondary malignancies in pediatric Hodgkin’s disease. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 5, p. 493–500, 10 fev. 2007.
- TEWEY, K. M. et al. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. **Science**, v. 226, n. 4673, p. 466–468, 1984.
- TIMM, K. N.; TYLER, D. J. **The Role of AMPK Activation for Cardioprotection in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity** *Cardiovascular Drugs and Therapy* Springer, , 1 abr. 2020.
- TODOROVA, V. K.; PENNISI, A.; MAKHOUL, I. Elevated levels of circulating neutrophil extracellular traps and prothrombotic state after one dose of chemotherapy to predict doxorubicin cardiotoxicity in breast cancer. https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.e12579, v. 36, n. 15_suppl, p. e12579–e12579, 1 jun. 2018.
- TODOROVA, V. K.; WEI, J. Y.; MAKHOUL, I. Subclinical doxorubicin-induced cardiotoxicity update: role of neutrophils and endothelium. **American Journal of Cancer Research**, v. 11, n. 9, p. 4070, 2021.

- VON HOFF, D. D. et al. Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. **Annals of internal medicine**, v. 91, n. 5, p. 710–717, 1979.
- VYAS, D.; LAPUT, G.; VYAS, A. K. Chemotherapy-enhanced inflammation may lead to the failure of therapy and metastasis. **OncoTargets and therapy**, v. 7, p. 1015, 12 jun. 2014.
- WALLACE, K. B.; SARDÃO, V. A.; OLIVEIRA, P. J. Mitochondrial Determinants of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. **Circulation research**, v. 126, n. 7, p. 926–941, 2020.
- WANG, J.-J.; LEI, K.-F.; HAN, F. Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 22-N. 12, p. 3855–3864, 2018.
- WARHOL, A. et al. Differential cardiotoxic electrocardiographic response to doxorubicin treatment in conscious versus anesthetized mice. **Physiological Reports**, v. 9, n. 15, 1 ago. 2021.
- WENNINGMANN, N. et al. **Insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: Molecular mechanisms, preventive strategies, and early monitoring** *Molecular Pharmacology* American Society for Pharmacology and Experimental Therapy, , 2019.
- WU, S. et al. Anticancer effects of α -Bisabolol in human non-small cell lung carcinoma cells are mediated via apoptosis induction, cell cycle arrest, inhibition of cell migration and invasion and upregulation of P13K/AKT signalling pathway. **JBUON**, v. 23, n. 5, p. 1407–1412, 2018.
- YOUNIS, N. S. et al. Geraniol isolated from lemon grass to mitigate doxorubicin-induced cardiotoxicity through Nrf2 and NF- κ B signaling. **Chemico-Biological Interactions**, v. 347, p. 109599, 25 set. 2021.
- YU, X. et al. Dexrazoxane ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibiting both apoptosis and necroptosis in cardiomyocytes. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 523, n. 1, p. 140–146, 26 fev. 2020.
- 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 (ESC). **European Heart Journal**, v. 37, n. 36, p. 2768–2801, 21 set. 2016.
- ZHANG, S. et al. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Nature Medicine**, v. 18, n. 11, p. 1639–1642, nov. 2012.
- ZHANG, X. et al. FNDC5 alleviates oxidative stress and cardiomyocyte apoptosis in doxorubicin-induced cardiotoxicity via activating AKT. **Cell death and differentiation**, v. 27, n. 2, p. 540–555, 1 fev. 2020.
- ZHAO, L.; ZHANG, B. Doxorubicin induces cardiotoxicity through upregulation of death receptors mediated apoptosis in cardiomyocytes. **Scientific reports**, v. 7, 16 mar. 2017.
- ZHAO, Y. et al. Nox2 NADPH oxidase promotes pathologic cardiac remodeling associated with doxorubicin chemotherapy. **Cancer Research**, v. 70, n. 22, p. 9287–9297, 15 nov. 2010.