

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO – UFES
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

FABRÍCIO BRAGANÇA DA SILVA

**EFEITOS DO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO E
HORMONIOTERÁPICO SOBRE BIOMARCADORES DE
LESÃO CARDÍACA E ESTRESSE OXIDATIVO EM
MULHERES COM CÂNCER DE MAMA**

VITÓRIA – ES
2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO – UFES
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

FABRÍCIO BRAGANÇA DA SILVA

**EFEITOS DO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO E
HORMONIOTERÁPICO SOBRE BIOMARCADORES DE
LESÃO CARDÍACA E ESTRESSE OXIDATIVO EM
MULHERES COM CÂNCER DE MAMA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas. Orientador: Prof^a. Dr^a Gláucia Rodrigues de Abreu. Coorientadora: Walckiria Garcia Romero

VITÓRIA – ES
2014

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho as pessoas que comigo sonharam a realização desta conquista – minha família e amigos tão queridos. E também a cada paciente que tão gentilmente cedeu um pouco de si, contribuindo imensamente para o avanço do conhecimento científico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, o autor de minha história, pela direção em todo tempo; mesmo quando por vezes me achava confuso me deu a chance de vivenciar que para Ele as trevas e luz são iguais, incapazes de ocultar-me à sua face – “minhas fontes estão todas em ti” (Salmo 87.7).

A minha mãe, minha vó, meus irmãos e sobrinhos, por todo apoio e amor.

A minhas irmãs do coração Cristiane, Dulce, Analice e Líbia por segurar as cordas da intercessão.

A Prof^a e Dr^a Gláucia Rodrigues de Abreu, minha orientadora e amiga, por todo suporte e direcionamento para que esta pesquisa fosse possível; pela confiança e credibilidade e pelo modelo de profissionalismo e ética.

A minha grande amiga e coorientadora Walckíria Garcia Romero. Com você tenho aprendido como ser enfermeiro, professor, pesquisador e a vivenciar a verdade que diz que “há amigos mais chegados que um irmão”.

A professora Sônia Alves Gouvêa, por abrir a mim as portas da ciência, pela amizade e apoio desde minha graduação. Se procurarmos encontraremos asas em você.

A professora Silvana S. Meyrelles, que tão gentilmente me concedeu a honra de compor minha banca avaliadora. Muito mais do que sua competência científica sua contribuição trouxe alma a este trabalho.

Aos meus amigos da pós-graduação Simone, Mariana, Cintia, Renata, Suelen, Angelina, Nathalie, Erick, Vinícius, Paulo e Wender, por me apoiar e me suportar sempre. A amizade de vocês foi o tesouro mais precioso que garimpei nestes anos.

RESUMO

O aumento das mortes por doenças cardiovasculares em mulheres submetidas aos tratamentos antineoplásicos para o câncer de mama é um fato observado em diversos trabalhos e está associado principalmente aos efeitos cardiotoxicos da quimioterapia. A cardiotoxicidade dos agentes quimioterápicos, embora não esteja totalmente esclarecida, acredita-se estar relacionada com o aumento dos níveis de estresse oxidativo no organismo. A detecção destes danos embasa os objetivos deste trabalho em avaliar os efeitos dos tratamentos contra o câncer de mama sobre biomarcadores de lesão cardíaca e estresse oxidativo. Trinta mulheres foram acompanhadas durante um ano e divididas de acordo com o protocolo terapêutico em mulheres tratadas exclusivamente com a hormonioterapia com tamoxifeno (grupo Tam, n=10), mulheres tratadas exclusivamente com quimioterapia (grupo Químio, n=10) e mulheres tratadas com quimioterapia e em seguida com hormonioterapia com tamoxifeno (grupo Químio+Tam, n=10). Amostras de sangue foram coletadas antes do início do tratamento, seis e doze meses após, para análise da troponina I cardíaca (cTnI), produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) e atividade plasmática da enzima antioxidante glutatona peroxidase (GPx). Ao término da pesquisa observou-se que mulheres do grupo Químio exibiam um aumento dos níveis de cTnI e AOPP e uma menor atividade da GPx plasmática quando comparadas às mulheres dos grupos Tam e Químio+Tam. Estes dados reforçam a hipótese do envolvimento do estresse oxidativo no desenvolvimento das doenças cardiovasculares num período crônico após o término da quimioterapia e ressaltam uma ação cardioprotetora da hormonioterapia com o tamoxifeno; além de acrescer subsídios científicos para adoção de políticas públicas mais efetivas no monitoramento e terapêuticas das duas mais importantes causas de morbimortalidade da população: o câncer e as doenças cardiovasculares.

Palavras chaves: câncer de mama; doenças cardiovasculares; quimioterapia; tamoxifeno; estresse oxidativo; lesão cardíaca; biomarcadores.

ABSTRACT

The increase in deaths from cardiovascular disease in women submitted to antineoplastic treatments for breast cancer is a fact observed in many works and is most often associated with cardiotoxic effects of chemotherapy. Although not well understood, it is believed that the cardiotoxicity of chemotherapeutic agents are associated with the increase in oxidative stress. The aim of the present study was to assess the effects of the treatments against breast cancer on biomarkers of cardiac injury and oxidative stress. Thirty women were monitored for one year and divided according to the therapeutic protocol: women subjected to hormone therapy with tamoxifen (Tam group, n = 10), women treated with chemotherapy (chemo group, n = 10), and women treated with chemotherapy followed by hormone therapy with tamoxifen (Chemo+Tam group, n = 10). Blood samples were collected in three moments, before initiation of treatment and after six, and twelve months for the analysis of cardiac troponin I (cTnI), advanced oxidation protein products (AOPP) and plasma activity of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase (GPx). We observe that women in the Chemo group showed increased levels of cTnI and AOPP and lower plasma activity of GPx when compared to Tam and Chemo + Tam groups. These data reinforce that oxidative stress may play a significant role in the development of cardiovascular diseases after chemotherapy treatment and highlights a cardioprotective effect of hormone therapy with tamoxifen. Furthermore, accumulated scientific evidence supports the adoption of more effective public policies in monitoring and treatment of the most important causes of morbidity and mortality in the population: cancer and cardiovascular disease.

Key words: breast cancer; cardiovascular diseases; chemotherapy; tamoxifen; oxidative stress; cardiac injury; biomarkers.

“Não se pode ensinar nada a um homem; só é possível ajudá-lo a encontrar a coisa dentro de si”.

Galileu Galilei

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo enzimático de defesa antioxidante.	13
Figura 2. Mecanismo da cardiotoxicidade das antraciclinas.....	15
Figura 3. Estruturas químicas do estrogênio e tamoxifeno e seus efeitos positivos e negativos em mulheres adultas.....	17
Figura 4. Cronograma de divisão dos grupos de acordo com o protocolo terapêutico e coletas das amostras sanguíneas.	22
Figura 5. Concentração sérica de cTnI dos diferentes grupos durante os 12 meses de avaliação.	28
Figura 6. Concentração plasmática de AOPP dos diferentes grupos durante os 12 meses de avaliação.....	29
Figura 7. Atividade plasmática da GPx dos diferentes grupos durante os 12 meses de avaliação.	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização das pacientes, doença e tratamento dos grupos avaliados.	26
---	----

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

AOPP	Produtos avançados de oxidação proteínas
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cTnI	Troponina I cardíaca
DCV	Doenças cardiovasculares
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxignio
FEVE	Fração de ejeção ventricular esquerda
GPx	Glutaciona peroxidase
Grupo Quimio	Mulheres tratadas com quimioterapia
Grupo Quimio+Tam	Mulheres tratadas com quimioterapia + tamoxifeno
Grupo Tam	Mulheres tratadas com tamoxifeno
GSR	Glutaciona redutase
PCR	Proteína C-reativa
SERMs	Modulador seletivo dos receptores de estrogênio
SOD	Superóxido dismutase
T0	Coleta de dados no início da pesquisa
T12	Coleta de dados dose meses após o início da pesquisa
T6	Coleta de dados seis meses após o início da pesquisa
TnI	Troponina I
TnT	Troponina T

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL.....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 DESENHO DO ESTUDO.....	21
3.2 AMOSTRAS SANGUÍNIAS.....	22
3.3 ANÁLISE DAS CONCENTRAÇÕES DE TROPONINA I CARDÍACA.....	23
3.4 DETERMINAÇÃO DOS PRODUTOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO DE PROTEÍNAS	23
3.5 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS.....	24
3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PLASMÁTICA DA GLUTATIONA PEROXIDASE.....	24
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
4. RESULTADOS	26
5. DISCUSSÃO	31
6. CONCLUSÃO	38
7. REFERÊNCIAS	39

1. INTRODUÇÃO

O período da pós-menopausa é marcado por significativas mudanças funcionais no organismo feminino, concebidas como parte do processo de senescência (SOUZA, TEZINI, 2013). No entanto, considerando as associações de fatores genéticos e ambientais, corresponde também a esta fase do ciclo vital o aumento na incidência de algumas doenças crônicas não transmissíveis, como o câncer de mama e doenças cardiovasculares (DCV), as quais assumem posições de destaque no índice de morbimortalidade no Brasil e no mundo (MOSCA et al., 2007; INCA, 2014).

A explicação deste fato, em suma, incide sobre o fenômeno de transição epidemiológica das doenças, onde as doenças não-transmissíveis somam metade das causas de mortes entre mulheres adultas em todo o mundo, com uma respectiva variância de 25 a 80% entre os países subdesenvolvidos e desenvolvidos (WHO, 2009). Dados mais recentes do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) afirmam que dentre as principais causas de morte da população feminina norte americana as DCV são responsáveis por 23,5%, seguidas pelo câncer (22,1%) e o acidente vascular encefálico (6,2%), com prevalência acentuada em mulheres acima dos 45 anos de idade (HERON, 2013). Neste contexto, Olszanecka et al. (2010) chamam a atenção ao fato de que a cada ano mais da metade dos registros de mortes em mulheres que ocorrem em todo mundo (55%) referem-se às DCV, com um aumento progressivo das morbidades relacionadas, mas que no entanto o envelhecimento populacional apenas explica em parte essa alta incidência.

Entre as DCV e o câncer de mama traça-se uma correlação que exhibe a participação do estrogênio como outro fator de risco comum, além dos riscos não modificáveis como a idade e heranças gênicas. De um polo, o surgimento do câncer de mama em parte se deve a atuação do estrogênio como um mediador do processo de proliferação das células do tecido mamário, o que incrementa os riscos do surgimento da doença (THULER, 2003). Do outro, a diminuição ou ausência deste hormônio agrega danos cardiovasculares no que diz respeito a consequente supressão de seus efeitos cardioprotetores, como a liberação de óxido nítrico, prostaciclina e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (FORYST-LUDWIG, KINTSCHER, 2010).

Contudo, quando se considera o avanço das tecnologias de diagnósticos e tratamento para o câncer de mama na última década, observa-se um aumento paralelo da expectativa de vida dos pacientes; porém, divergentemente o risco competitivo de morte em longo prazo por outras causas não relacionadas ao câncer de mama também vem aumentando à medida que estas mulheres ficam mais velhas (DU, FOX, LAI, 2008).

Consonante a este fato, Chapman et al. (2009) acrescentam que a sobrevida global é o resultado terapêutico mais importante para os pacientes com câncer de mama, mas ao abordar as principais causas de morte neste grupo sugere-se que parte delas estão relacionadas as terapêuticas adotadas no tratamento da doença e não simplesmente com o câncer em si.

Atualmente, para o tratamento das neoplasias mamárias utiliza-se a quimioterapia e/ou a hormonioterapia. Os quimioterápicos frequentemente apresentam, além do efeito citotóxico ou citostático na célula tumoral, resultados adversos severos sobre o sistema cardiovascular, dentre eles destacando-se o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais contribuem para o desenvolvimento ou agravamento de DCV pré-existentes (BRANDOLT, 2008; MACHADO et al, 2008).

A produção de ERO ou espécies reativas de nitrogênio (ERN) é um processo inerente aos organismos aeróbicos, desencadeada naturalmente durante o metabolismo celular ou em resposta alguma disfunção biológica. A regulação da concentração destas espécies reativas é feita pelo sistema antioxidante enzimático (superóxido dismutase [SOD]; glutathione peroxidase [GPx]; glutathione redutase [GSR] e catalase) e não enzimático (glutathione [GSH]; coenzima Q10, CoQ10), presentes no próprio organismo ou adquiridos na dieta (α -tocoferol, β -caroteno, ácido ascórbico e outros) (EVANS, HALLIWELL, 2001; BARBOSA et al., 2010; NATHAN et al., 2011) (FIGURA 1). No entanto, o desequilíbrio a favor da produção das ERO e ERN leva a ocorrência de danos a diferentes estruturas celulares, como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA, caracterizando, assim, o estresse oxidativo (BARREIROS, DAVID, 2006).

O stress oxidativo é apontado como componente chave na fisiopatologia das DCV, bem como promoção de seus agravos (MONTERA, 2007; KUROKAWA et al., 2011) e na relação negativa com os agentes quimioterápicos (MEINARDI et al., 1999; ZHAO et al., 2010; CHARGARI et al., 2011; KY, CARVER, 2011).

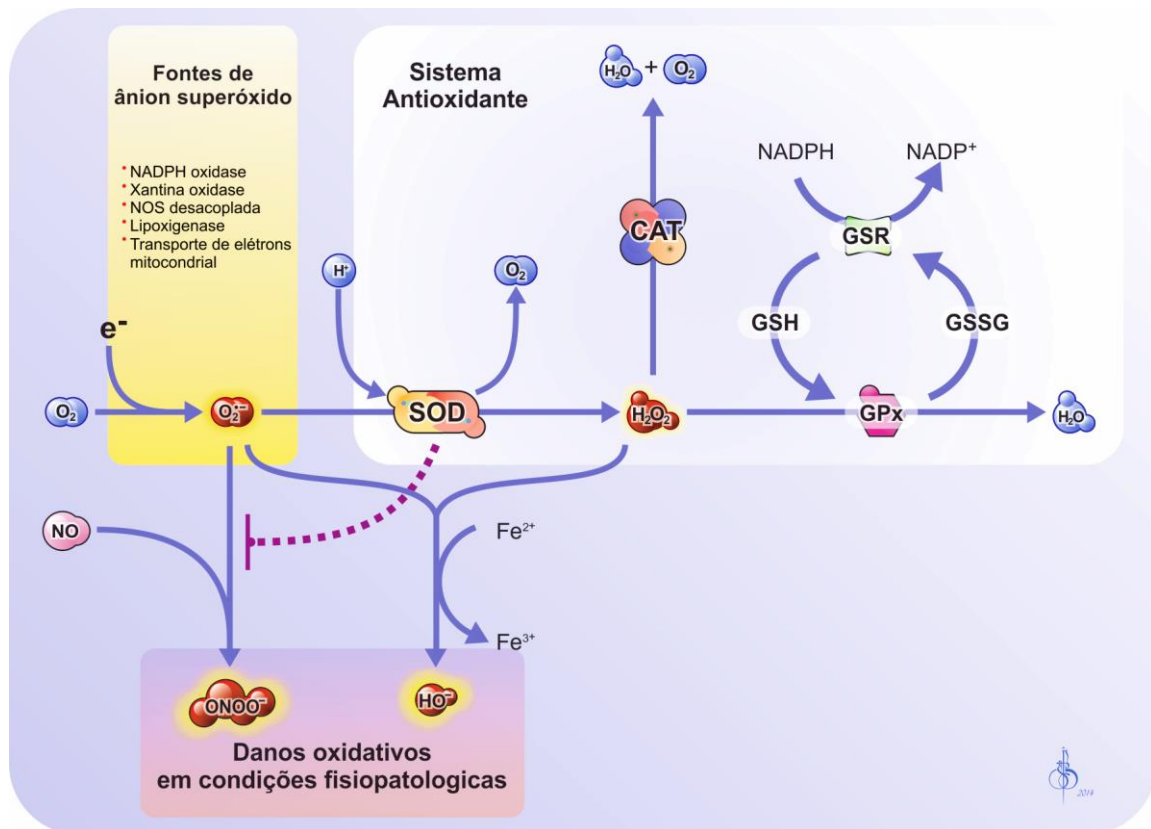


Figura 1. Mecanismo enzimático de defesa antioxidante. Em destaque estão as principais fontes endógenas produtoras de ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) e as enzimas responsáveis por controlar suas concentrações no organismo. Estruturas em vermelho representam diferentes espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. SOD, superóxido dismutase; CAT, catalase; GPx, glutatona peroxidase; GSR, glutatona redutase, GSH, glutatona; GSSG, glutatona oxidada; NO, óxido nítrico, H_2O_2 , peróxido de hidrogênio, $ONOO^-$, peroxinitrito; HO^\bullet , hidroxila; Fe^{2+} , óxido ferroso; Fe^{3+} , óxido férrico.

Segundo a Diretriz Brasileira de Cardio-Oncologia (KALIL FILHO et al., 2011), as DCV nos pacientes com câncer são eventos cada vez mais frequentes não apenas pelos avanços terapêuticos, mas também pela maior exposição dos pacientes a fatores de

risco cardiovasculares e à quimioterapia com potencial cardiotoxicidade, dentre as quais destacam-se os antibióticos antraciclina (doxorubicina, epirrubina), os agentes alquilantes (ciclofosfamidas) e os agentes antimetabólicos (5-fluorouracil).

Diferentes trabalhos caracterizam as antraciclina como uma classe de quimioterápicos com proeminente cardiotoxicidade, capazes de modular por meio do estresse oxidativo o metabolismo mitocondrial (CARVALHO et al., 2010) e danificar as propriedades contráteis e estruturais do coração (CARDINALE et al., 2000; HEIDE, L'ECUYER, 2007; VERMA, EWER, 2011; JIJI, KRAMER, SALERNO, 2012), além de induzir a apoptose dos cardiomiócitos (THORBURN, FRANKEL, 2006). No entanto, estes mecanismos ainda não estão bem esclarecidos. A síntese das principais hipóteses da cardiotoxicidade das antraciclina, ressaltando os possíveis mecanismos pelos quais ocorrem as alterações patológicas típicas em cardiomiócitos observadas em estudos experimentais e clínicos, como o aumento da produção de ERO, alterações mitocondriais e degeneração do retículo sarcoplasmático, dos miofilamentos contráteis e de estruturas do DNA (GEISBERG, SAWYER, 2010) estão representados na figura 2.

Além dos tratamentos quimioterápicos e hormonioterápicos a radioterapia também demonstra efeitos cardiovasculares adversos que podem ser potencializados pelas combinações terapêuticas (CHARGARI et al., 2011). Bovelli, Plataniotis e Roila (2010) afirmam que a toxicidade cardiovascular relacionada à radioterapia pode ser progressiva, interferindo em complexos mecanismos, corroborando no desenvolvimento de doenças coronarianas, no mau funcionamento das válvulas e músculo cardíaco, bem como no sistema de condução e na função sistólica.

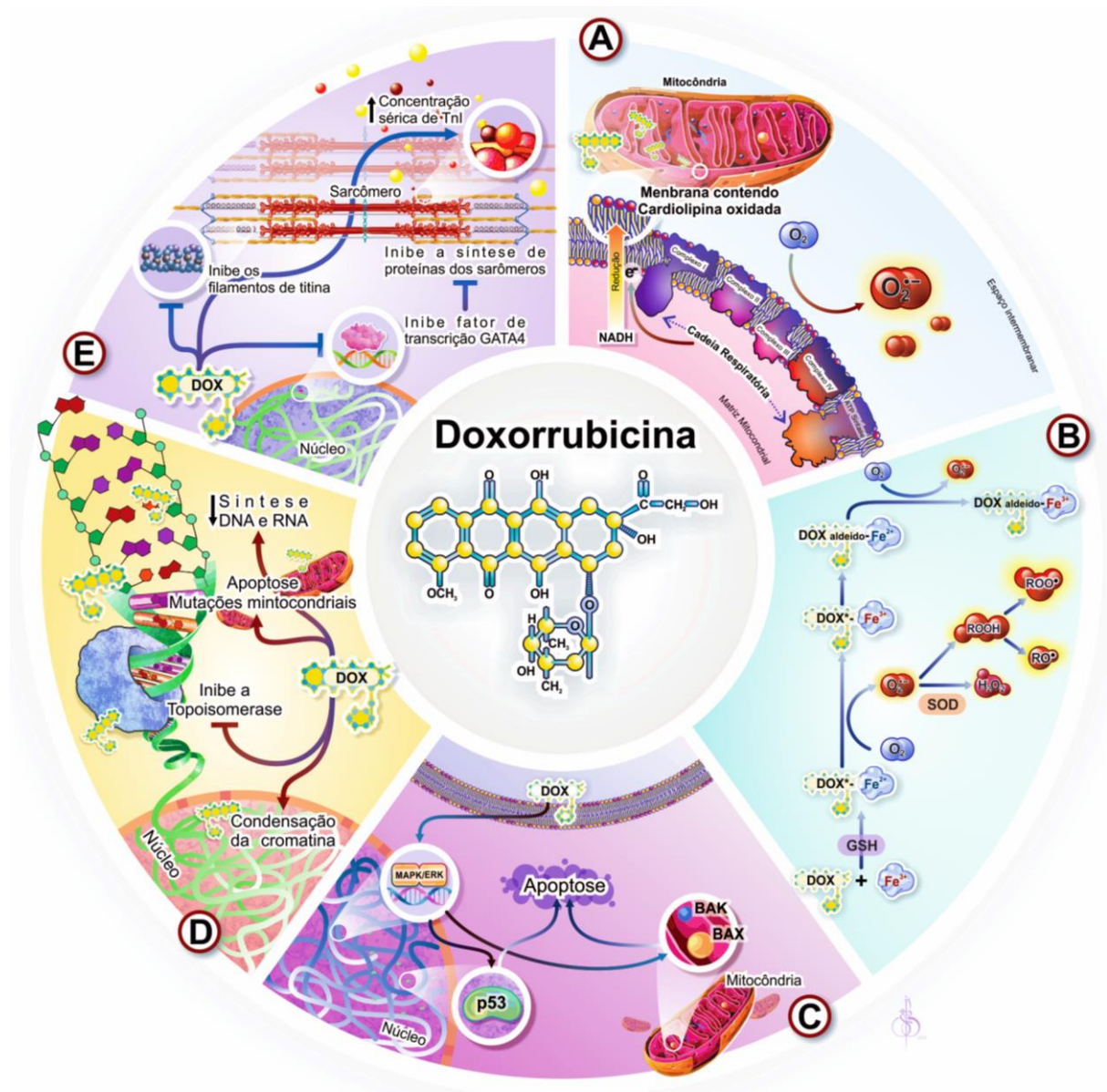


Figura 2. Mecanismos da cardiotoxicidade das antraciclinas. Ao centro, a estrutura química da doxorrubicina (DOX), um antibiótico da família das antraciclinas. A) A DOX oxida a cardiolipina, que é então reduzida pela NADH ao sequestrar um elétron da cadeia respiratória mitocondrial e consequentemente reduzem o oxigênio (O_2) a ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$). B) A DOX pode reagir diretamente com óxido férrico (Fe^{3+}) e levar a produção de ERO (ROO^{\cdot} , peroxila; RO^{\cdot} , alcoxila; e $O_2^{\cdot-}$). C) A DOX, por meio do stress oxidativo, ativa a via sinalização celular MAPK/ERK em cardiomiócitos, aumentando a expressão de fatores pró apoptóticos (p53, BAX e BAK). D) A DOX pode se ligar de forma não covalente ao DNA e também inibir a topoisimerase, o que provavelmente contribui para a morte dos cardiomiócitos e as mutações mitocondriais. E) A DOX propicia o downregulation do fator transcrional GATA4, que regula genes

cardíacos específicos e anti-apoptóticos, interferindo na síntese de estruturas do sarcolema e sobrevivência celular; além poderem degradar diretamente proteínas contrateis, como a tinina, contribuindo para o desenvolvimento de cardiomiopatias. Abreviações: Fe^{2+} óxido ferroso; ROOH, radicais peróxidos; H_2O_2 , peróxido de hidrogênio; SOD, superóxido dismutase; GSH, glutationa; Tnl, troponina I. Baseado no texto de Geisberg e Sawyer, 2010.

Neste contexto, mulheres diagnosticadas com câncer de mama primário e que possuem receptores de estrogênio positivos no tecido tumoral são direcionadas ao tratamento hormonal com tamoxifeno, na tentativa de minimizar o risco de recidiva nos cinco primeiros anos após a cirurgia (período de maior reincidência) (MARKOPOULOS, 2010).

O tamoxifeno primeiramente foi descrito em 1967 como um agente contraceptivo potencial, pertencente à classe das moléculas denominadas trifeniletlenos, derivadas a partir do dietilestilbestrol, um agonista do estrogênio sintetizado em 1938. Em sua estrutura molecular uma cadeia central semelhante ao estilboestrol parece ser responsável pelos efeitos antiestrogênicos, tendo como alvo farmacológico os receptores de estrogênio, o gene produtor de resistência a múltiplas drogas, glicoproteínas permeáveis (glicoproteína-P) e o receptor de estrogênio acoplado à proteína G (GPER) (BEHJATI, FRANK, 2009).

Este fármaco funciona como um modulador seletivo dos receptores de estrogênio (SERMs) com ação antagonista no lóbulo mamário que inibe a expressão gênica de fatores de crescimento e fatores angiogênicos secretados pelas células tumorais (mecanismo autócrinos e parácrinos de proliferação), por meio do bloqueio na fase G1 do ciclo mitótico e uma desaceleração da propagação celular, capazes de regredir o tumor e também induzir diretamente a apoptose (CRISCITIELLO et al., 2011).

O tamoxifeno também pode estimular de forma agonista ou antagonista os receptores de estrogênio em outros tecidos e desencadear uma variedade de efeitos benéficos ou adversos, como por exemplo: proteção óssea contra osteoporose e sintomas da pós-menopausa; um aumento no risco de câncer endometrial, tromboembolismo venoso e acidente vascular encefálico (NELSON et al., 2013). A Figura 3 ilustra e

compara os efeitos benéficos e deletérios mediados pela ação do estrogênio e do tamoxifeno sobre os receptores de estrogênio em diferentes órgãos.

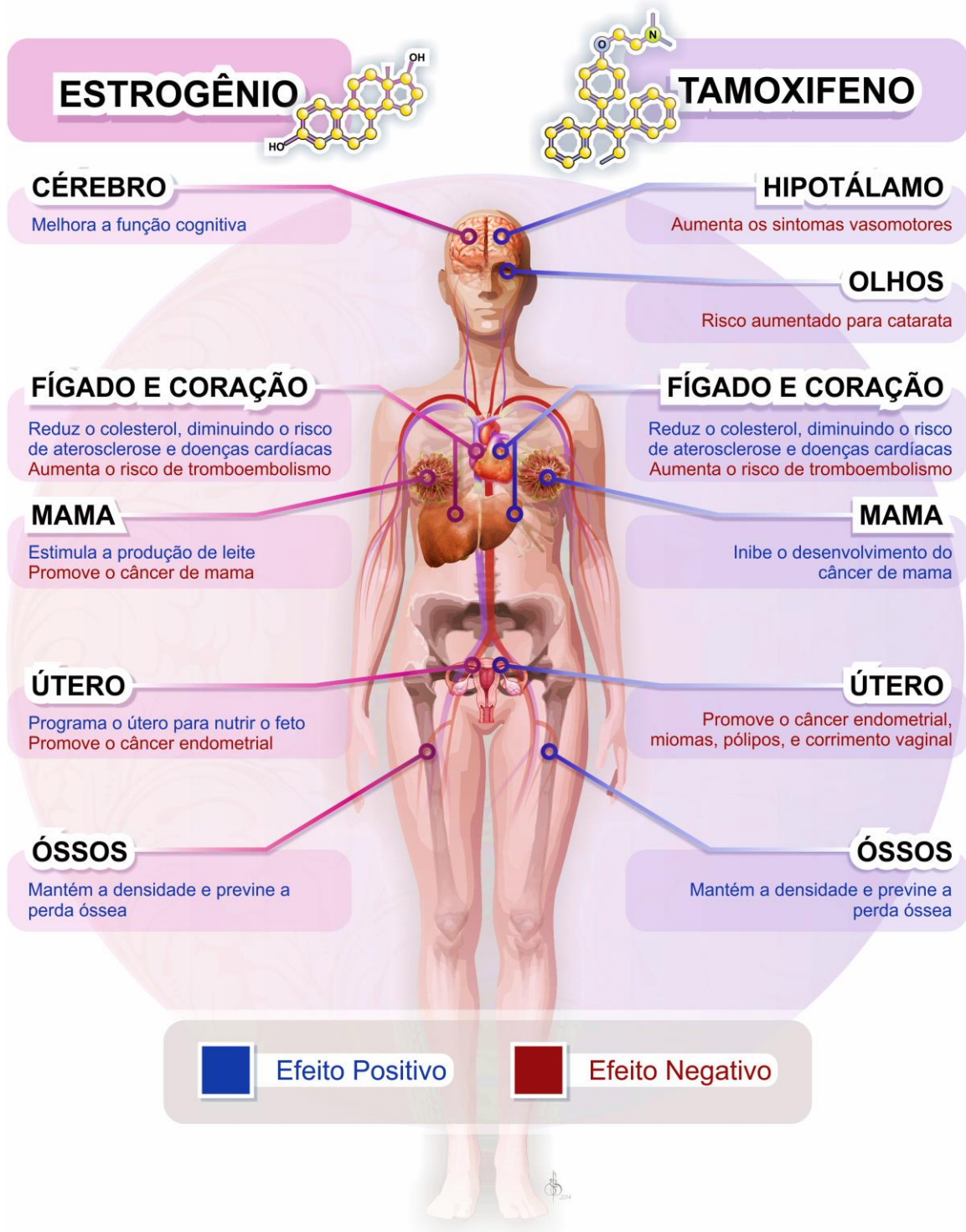


Figura 3. Estruturas químicas do estrogênio e tamoxifeno e seus efeitos positivos e negativos em mulheres adultas. Fonte: Adaptado de Ali, Buluwela e Coombes, 2011.

A atividade agonista do tamoxifeno sobre os hepatócitos foi evidenciada em diferentes pesquisas as quais demonstram seus efeitos benéficos sobre o perfil lipídico, como redução sérica de lipoproteína de baixa densidade, colesterol total, lipoproteína A, apolipoproteína B, triglicerídeos e aumento da apolipoproteína A1 e lipoproteína de alta densidade, todos em associação com uma redução do eventos cardíacos em pacientes com câncer de mama (ATALAY, 2004; JONES et al., 2007; ALI, BULUWELA, COOMBES, 2011; BACCIN et al., 2011).

A cardioproteção relacionada ao tamoxifeno também foi evidenciada por meio da redução da proteína C-reativa (PCR), uma proteína inflamatória reconhecida como um importante biomarcador de risco cardiovascular (MYERS et al., 2009; MORRIS et al., 2011). Estudos clínicos utilizando terapia de reposição hormonal com tamoxifeno e similares, em mulheres saudáveis, apresentaram uma redução significativa do risco de DCV correlacionada aos níveis circulantes de PCR (BONANNI et al., 2003; EILERTSEN et al., 2008). Pierce et al. (2009), relatam que o tamoxifeno, de uma forma dose-dependente, reduz as concentrações plasmáticas de PCR em mulheres com tumores receptor de estrogênio-positivo possivelmente por seu efeito antagônico nos adipócitos, sobre a formação de citocinas, o que melhoraria o prognóstico por reduzir a inflamação sistêmica crônica.

Além disso, outro biomarcador para avaliação da lesão cardíaca discutido na atualidade é concentração das troponinas circulantes na corrente sanguínea, sensíveis e específicas proteínas, cujo o uso foi aprovado desde 2000 pelas Sociedades de Cardiologia Europeia e Americana (ALPERT, THYGESEN, 2000; ROONGSRITONG, WARRAICH, BRADLEY, 2004). As troponinas formam uma tríade (troponina C, TnC; troponina T, TnT; troponina I, TnI) de componentes ativos no processo de contração das células estriadas, regulando a interação cálcio-dependente da miosina com a actina, sendo que as isoformas TnT e TnI cardíacas se diferem geneticamente das isoformas do músculo esquelético, o que garante a especificidade diagnóstica de lesão das células cardíacas (GODOY, BRAILE, NETO, 1998).

De acordo com Cardinale et al. (2002), em pacientes submetidos a altas doses de quimioterapia para câncer de mama agressivo a TnI demonstrou ser um biomarcador sensível, específico e de baixo custo para prever o desenvolvimento de disfunção sistólica ventricular nos meses que se seguem após o tratamento; e também afirma

que a possibilidade de realização de uma estratificação de risco em uma população de pacientes, numa fase precoce, tem implicações clínicas e prognósticos relevantes.

De fato, determinar os efeitos dos quimioterápicos sobre o sistema cardiovascular tem sido um desafio para comunidade científica nas últimas décadas, dada a complexidade das inúmeras variáveis que cercam os diferentes grupos populacionais e as respostas particulares de cada indivíduo aos tratamentos (HERSHMAN, NEUGUT, 2008).

Apesar da cardiotoxicidade causada pela quimioterapia e radioterapia já estar bem estabelecida por inúmeros trabalhos, mulheres com câncer de mama são avaliadas somente quanto ao risco de recidiva da doença, não havendo qualquer avaliação efetiva quanto ao risco cardiovascular durante o tratamento. A detecção precoce dos riscos de complicações cardiovasculares, advindos de tais terapêuticas, centraliza as investigações de outros métodos diagnósticos, tais como os biomarcadores. Exatamente porque estes tem demonstrado reprodutibilidade, alta sensibilidade, melhor custo e acurácia na identificação de pacientes em estágios pré-clínicos; além de corroborarem com os métodos já consolidados pela de eletrocardiograma e exames por imagem da fração de ejeção ventricular esquerda (FEVE), prescritos na Diretriz Brasileira de Cardio-Oncologia, incrementando uma maior sobrevida a estes pacientes.

Com isso, esta pesquisa objetivou-se avaliar os efeitos do tratamento quimioterápico e hormonioterápico sobre biomarcadores de lesão cardíaca e estresse oxidativo em mulheres com câncer de mama.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do tratamento quimioterápico e hormonioterápico sobre biomarcadores de lesão cardíaca e estresse oxidativo em mulheres com câncer de mama.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar em pacientes com câncer de mama:

- A concentrações séricas de troponina I.
- A concentrações plasmática de produtos avançados de proteínas oxidadas.
- A atividade antioxidante da isoforma plasmática da glutathiona peroxidase.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo longitudinal, transcorrido no período de agosto de 2012 a janeiro de 2014, com mulheres que se submeteriam aos tratamentos antineoplásicos para o câncer de mama, acolhidas nos ambulatórios do Hospital Santa Rita de Cássia, referência no tratamento de câncer no Espírito Santo.

Um total de oitenta e uma mulheres foram abordadas para esta pesquisa, das quais 49 atendiam aos critérios de inclusão tais como ausência de tratamento quimioterápico prévio e histórico de cardiomiopatias; não ser fumantes; não ter diagnóstico de diabetes; não ser hipertensa e não estar sob regime terapêutico de reposição hormonal. Deste montante, dezessete voluntárias não deram seguimento a coleta de amostras biológicas e foram excluídas da avaliação; e duas mulheres solicitaram a retirada de seus nomes por mudarem de hospital. Portanto, trinta mulheres foram avaliadas quanto os efeitos da quimioterapia e/ou hormonioterapia sobre biomarcadores de lesão cardíaca e estresse oxidativo. Todas as participantes assinaram o termo de consentimento livre esclarecido. Os critérios éticos foram respeitados segundo a resolução 196/96 que respalda as pesquisas envolvendo seres humanos, bem como os princípios descritos na declaração de Helsinque. A pesquisa só teve início após aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde/UFES, (parecer no 115.097/CAAE: 04929212.2.0000.5060).

A classificação da doença e protocolo terapêutico seguiu as referências do *Clinical Practice Guideline in Oncology* da *National Comprehensive Cancer Network*. A partir de então a divisão dos grupos pode ser melhor entendida por meio da figura 4, onde no início da pesquisa (T0) contou-se com mulheres que já haviam sido submetidas à cirurgia total ou conservadora da mama ou que ainda seriam submetidas à cirurgia. De acordo com as características histológicas e imunohistoquímica, uma parcela das mulheres seguiu o tratamento profilático exclusivo de hormonioterapia com tamoxifeno (grupo Tam, n=10), paralelo ao acompanhamento clínico, enquanto as demais foram submetidas à quimioterapia adjuvante (pós-cirúrgica) ou prévia (pré-cirúrgica). Destas, pelos mesmos critérios, uma parcela compôs o grupo tratado exclusivamente com

quimioterapia (grupo Químio, n=10) e a outra parcela, após o tratamento quimioterápico, incorporou ao tratamento a hormonioterapia com tamoxifeno (grupo Químio+Tam, n=10) e ambas paralelamente também tiveram acompanhamento clínico.

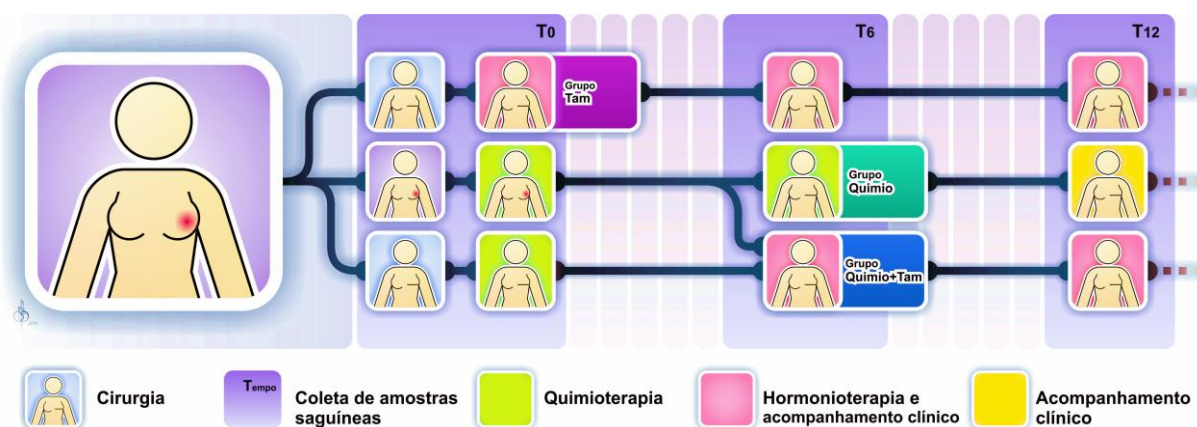


Figura 4. Cronograma de divisão dos grupos de acordo com o protocolo terapêutico e coletas das amostras sanguíneas. T0, início do tratamento; T6, seis meses após o início do tratamento; T12, doze meses após o início do tratamento.

3.2 AMOSTRAS SANGUÍNIAS

Amostras de sangue periférico foram coletadas de cada paciente no momento da admissão à pesquisa (T0), seis meses (T6) e doze meses após a primeira coleta (T12) usando-se técnicas convencionais de venipuntura periférica, preferivelmente em na fossa cubital, com seringa plástica e agulha descartável. Ao todo, 8 ml de sangue foram distribuídos em tubos sem anticoagulante para separação do soro e em tubos com EDTA para separação do plasma. As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm, por 10 minutos, a 4 °C, postas em alíquotas de 2 ml e estocadas em freezer -80 °C para posterior análise dos biomarcadores de lesão cardíaca e estresse oxidativo.

3.3 ANALISE DAS CONCENTRAÇÕES DE TROPONINA I CARDÍACA

Para análise das concentrações séricas de Tnl foi utilizado o kit específico Troponin I cardíaca (cTnl) Test System (Monobind Inc. – Lake Forest, CA 92630, USA) e a leitura foi feita no aparelho Synergy™ HT (BioTek® Instruments, Inc. - Winooski, VT 05404-0998, USA).

O ensaio é baseado no princípio de um imuno-ensaio fluorogênico ligado à enzima tipo “sanduíche” (anticorpo- antígeno-anticorpo ligado), ou de dois sítios, com anticorpos monoclonais de rato, antitroponina I cardíaca. A análise é realizada automaticamente pelo analisador Synergy™ HT. A concentração é reportada em nanogramas por mililitros (ng/mL) de soro. A faixa de ensaio do método é de 0,1 a 50,0 ng/ml. A sensibilidade analítica do ensaio é de 0,030 ng/ml. O valor de referência para normalidade estabelecido pelo laboratório para indivíduos saudáveis é menor do que 1,3 ng/mL.

3.4 DETERMINAÇÃO DOS PRODUTOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO DE PROTEÍNAS

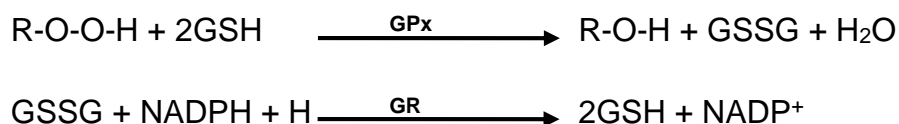
Os valores plasmáticos de produtos avançados de oxidação proteínas (Advanced Oxidation Protein Products [AOPP]) foram determinados por espectrofotometria em leitora de microplacas (Synergy™ HT). A reação foi calibrada com cloramina-T 0-100 μ M (Vetec) na presença de iodeto de potássio (KI) e ácido acético a 340 nm. O plasma foi diluído 1/5 em tampão fosfato (PBS), diretamente na microplaca (Kasvi K30-5096U). Em seguida, foi adicionado 10 μ L de iodeto de potássio 1.16 M e posteriormente foi adicionado 20 μ L de ácido acético glacial ultra puro. A densidade óptica foi lida imediatamente a 340 nm contra um controle contendo 200 μ L de PBS, 10 μ L de KI e 20 μ L de ácido acético. As análises foram realizadas em triplicata. As concentrações de AOPP foram expressas como μ M de cloramina-T/mg de proteína.

3.5 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

Para determinação das proteínas totais o plasma foi previamente diluído 1:100 em água destilada. As dosagens de proteínas totais foram realizadas utilizando o método de Bradford.

3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PLASMÁTICA DA GLUTATIONA PEROXIDASE

Atividade plasmática da GPx foi avaliada por um ensaio de enzima acoplada (Glutathione Peroxidase Assay Kit, Cayman Chemical Company – Ann Arbor, MI 48108, USA) que consiste na mensuração indireta da reação de acoplamento com a glutathione redutase (GR). A glutathione oxidada (GSSG), produzida por redução de hidroperóxido e da glutathione (GSH) pela GPx, é reciclada para o seu estado reduzido por meio da GR e NADPH:



A oxidação do NADPH é detectada em uma faixa de absorvância de 340 nm. A atividade foi medida num espectrofotómetro de microplaca (Synergy™ HT) em um volume final de 170 µL em cada poço com a seguinte composição: 100µL de tampão de ensaio, 50µL de uma mistura de co-substratos (NADPH, GSH e GR liofilizados) e 20µL de plasma em triplicatas. A reação foi iniciada após a adição do plasma ao tampão reagente pré-aquecido a 30 °C no leitor de placas, e avaliada por espectrofotometria a 340 nm durante 5 min. Foram utilizados os dados recolhidos no intervalo do 1º ao 4º minuto (porção linear da curva) de reação para análise. A atividade da GPx plasmática é equivalente à uma redução da absorvância de 0,02 a 0,135 por minuto e foi descrita como GPx nM/min/mL. O coeficiente de variação reportado pelo fabricante do kit é de 7,2%.

3.7 ANALISE ESTATÍSTICA

Para avaliar as diferenças entre os tratamentos quimioterápicos e hormonioterápicos foi utilizado análise de variância para medidas repetidas (ANOVA-RM), seguido pelo teste Tukey (post-hoc) para múltiplas comparações entre as médias. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média e valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Para os testes estatísticos e construção dos gráficos empregou-se o software GraphPad Prism versão 6.00 (GraphPad Software; San Diego, Califórnia, EUA).

4. RESULTADOS

Das mulheres inscritas nesta pesquisa verificamos que a idade entre os grupos foi de 53 anos em média e que a maioria encontrava-se no período da pós-menopausa (56,7%), com diagnóstico de câncer ductal invasivo (77%) em mama esquerda (63%). O índice de massa corporal foi equivalente entre os grupos e não se alterou durante os doze meses de acompanhamento. A cirurgia realizada com maior frequência foi a mastectomia parcial (57%) e modalidade quimioterápica mais adotada foi a adjuvante a base de antraciclinas (55%), com uma variabilidade de 4 a 8 ciclos (uma média de 7 e 6 ciclos para os grupos Químio e Químio+Tam, respectivamente); bem como trinta sessões de radioterapia para 80% das pacientes submetidas à quimioterapia. Os dados antropométricos, status hormonal, história da doença atual e do tratamento encontram-se mais detalhadamente descritos na tabela 1.

Tabela 1. Caracterização das pacientes, doença e tratamento dos grupos avaliados.

		(Continua)			
		Tam (n=10)	Químio (n=10)	Químio+Tam (n=10)	
Pacientes	Idade (média)	55	52	52	
	IMC (média)	T0	29,3	30,2	30,5
		T6	29,5	30,4	30,4
		T12	29,3	29,8	30,3
	Status hormonal (n)	Perimenopausa	2	3	3
		Menopausa	0	1	4
		Pós-menopausa	8	6	3
Doença	Tumor tipo (n)	Carcinoma ductal in-situ	4	0	0
		Carcinoma ductal invasivo	5	8	10
		Carcinoma lobular invasivo	1	1	0
		Carcinoma medular	0	1	0
	Lado da mama (n)	Direito	4	3	4
		Esquerdo	6	7	6
	Tamanho do Tumor (n)	<20 mm	8	4	5
		20-50 mm	2	5	5
		>50 mm	0	1	0

		(Conclusão)			
		Tam (n=10)	Quimio (n=10)	Quimio+Tam (n=10)	
Tratamento	Tipo de cirurgia (n)	Mastectomia total	2	6	5
		Mastectomia parcial	8	4	5
	Modalidade quimioterápica (n)	Neoadjuvante	NA	6	3
		Adjuvante	NA	4	7
	Regime Quimioterápico (n)	AC	NA	5	7
		AC+P	NA	1	2
		TC	NA	3	1
		TAC	NA	1	0
	Número de ciclos (média)		NA	7	6
	Radioterapia (n)	30 sessões	NA	8	8

Abreviações: **IMC**, Índice de massa corporal; **NA**, Não se aplica; **AC**, Antraciclina (Doxorubicina) + Ciclofosfamida; **AC+P**, AC seguida de paclitaxel; **TC**, Docetaxel + Ciclofosfamida; **TAC**, Docetaxel + Doxorubicina + Ciclofosfamida.

Observou-se que todos os grupos no T0 apresentavam concentrações séricas de cTnI equivalentes (Tam, $0,037 \pm 0,003$ ng/mL; Quimio, $0,037 \pm 0,001$ ng/mL; Quimio+Tam, $0,041 \pm 0,002$ ng/mL), mas ao término da pesquisa (T12) apenas o grupo Quimio apresentou níveis séricos de cTnI significativamente maiores ($0,065 \pm 0,006$ ng/mL, $p < 0,05$) quando comparados aos grupos Tam ($0,031 \pm 0,001$ ng/mL) e Quimio+Tam ($0,037 \pm 0,002$ ng/mL). De fato, no grupo Quimio este aumento foi detectado a partir do T6 ($0,045 \pm 0,003$ ng/mL, $p < 0,05$), quando comparado ao T0 (Quimio, $0,037 \pm 0,001$ ng/mL), mas não se difere dos demais grupos no mesmo período (T6: Tam, $0,035 \pm 0,003$ ng/mL; Quimio+Tam, $0,040 \pm 0,002$ ng/mL). Já os grupos Tam e Quimio+Tam mantiveram os níveis séricos de cTnI constantes durante toda a pesquisa (T0: $0,037 \pm 0,003$ ng/mL; $0,041 \pm 0,002$ ng/mL; T6: $0,035 \pm 0,003$ ng/mL; $0,040 \pm 0,002$ ng/mL; T12: $0,031 \pm 0,001$ ng/mL; $0,037 \pm 0,002$ ng/mL, respectivamente) (Figura 5).

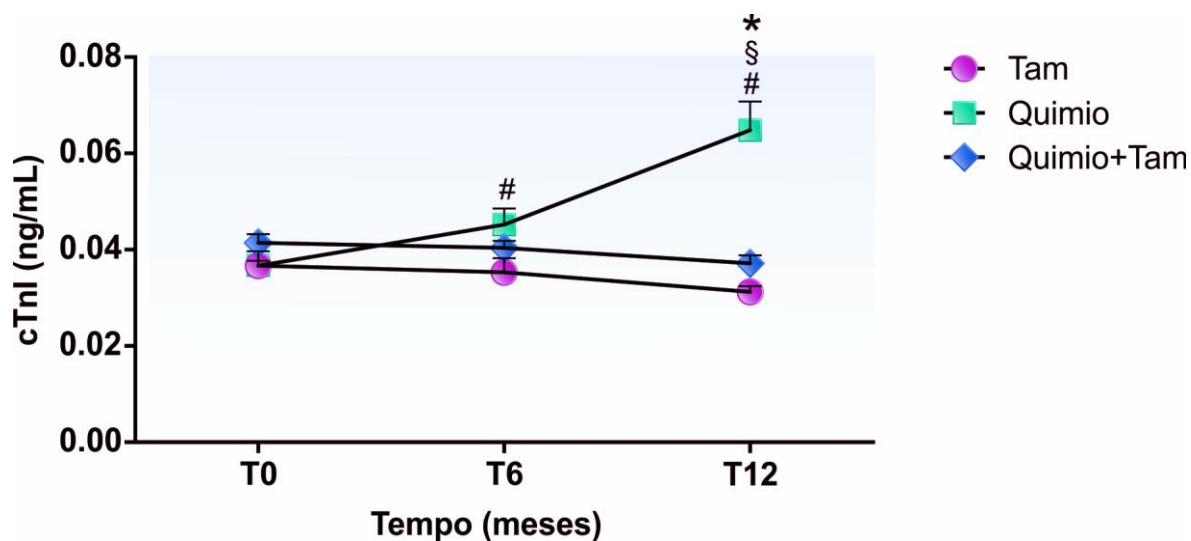


Figura 5. Concentração sérica de cTnI dos diferentes grupos durante os 12 meses de avaliação. # $p < 0,05$, comparado com T0; § $p < 0,05$, comparado com T6; * $p < 0,05$, comparado aos grupos Tam e Químio+Tam.

Na figura 6, quando se compara as concentrações dos níveis de AOPP de cada grupo, nos distintos tempos de análise, observa-se que apenas o grupo Químio demonstrou uma maior concentração no T12 ($4,99 \pm 0,84 \mu\text{mol/L}$, $p < 0,05$) em relação aos T0 ($2,13 \pm 0,19 \mu\text{mol/L}$) e T6 ($3,03 \pm 0,69 \mu\text{mol/L}$). No entanto, numa análise pareada dos grupos, apenas observa-se diferença dos níveis plasmáticos de AOPP no T12, onde o grupo Químio exibe níveis de AOPP significativamente maiores ($4,99 \pm 0,84 \mu\text{mol/L}$, $p < 0,05$) do que os grupos Tam ($1,40 \pm 0,10 \mu\text{mol/L}$) e Químio+Tam ($2,53 \pm 0,30 \mu\text{mol/L}$). É relevante observar também que no T12 o Químio+Tam apresentou níveis de AOPP significativamente maiores do que grupo Tam ($2,53 \pm 0,30 \mu\text{mol/L}$; $1,40 \pm 0,10 \mu\text{mol/L}$, respectivamente), apesar de manter níveis semelhantes ao início do tratamento.

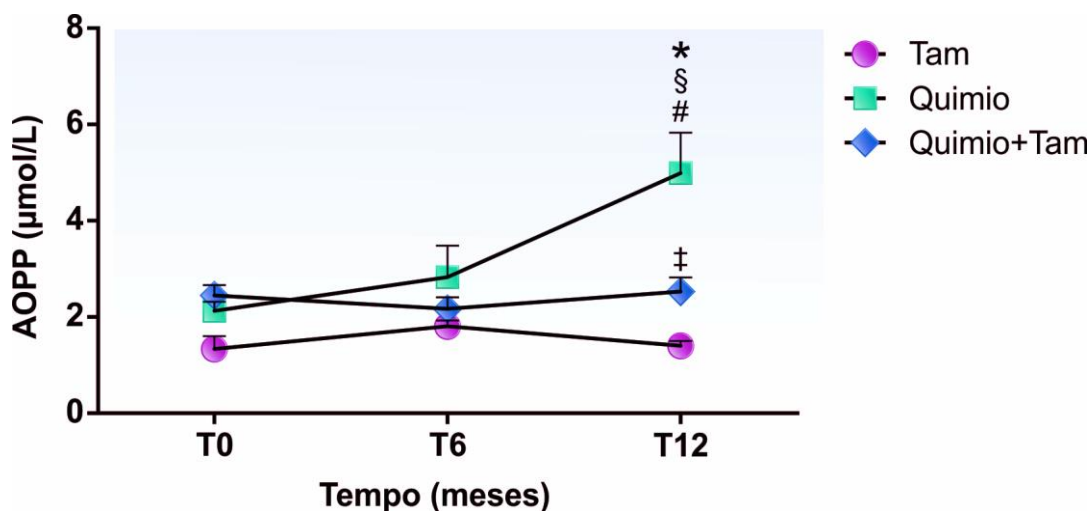


Figura 6. Concentração plasmática de AOPP dos diferentes grupos durante os 12 meses de avaliação. # $p < 0,05$, comparado com T0; § $p < 0,05$, comparado com T6; * $p < 0,05$, comparado com os grupos Tam e Químio+Tam; ‡ $p < 0,05$, comparado com o grupo Tam.

Conforme a figura 7, verificou-se que no T0 todos os grupos exibiam parâmetros de atividade enzimática da GPx plasmática equivalentes (Tam, $27,6 \pm 0,3$ nM/min/mL; Químio, $25,3 \pm 1,5$ nM/min/mL; Químio+Tam, $25,5 \pm 0,9$ nM/min/mL), mas a partir do T6 o grupo Químio+Tam apresentou uma atividade da GPx maior ($28,4 \pm 1,3$ nM/min/mL, $p < 0,05$) quando comparada ao T0 ($25,5 \pm 0,9$ nM/min/mL), a qual foi sustentada até o T12 ($29,5 \pm 1,0$ nM/min/mL, $p < 0,05$). O grupo Tam não demonstrou nenhuma alteração na atividade da GPx durante todo curso da pesquisa (T0, $27,6 \pm 0,3$ nM/min/mL; T6, $27,3 \pm 0,2$ nM/min/mL; T12, $28,0 \pm 0,7$ nM/min/mL). Já o grupo Químio pareceu exibir uma tendência na elevação da atividade da GPx no T6 ($27,4 \pm 1,0$ nM/min/mL), mas que não foi possível detectar uma diferença significativa em relação T0 ($25,3 \pm 1,5$ nM/min/mL); contudo, essa tendência parece se confirmar quando analisamos uma diminuição significativa de sua atividade no T12 ($24,4 \pm 1,1$ nM/min/mL, $p < 0,05$) em relação ao T6 ($27,4 \pm 1,0$ nM/min/mL). Paralelamente, podemos também constatar que o grupo Químio no T12 exibiu uma redução da atividade da GPx ($24,4 \pm 1,1$ nM/min/mL, $p < 0,05$), diferenciando-se significativamente dos grupos Tam e Químio+Tam ($28,0 \pm 0,7$ nM/min/mL; $29,5 \pm 1,0$ nM/min/mL, respectivamente), enquanto entre estes não foram detectadas diferenças.

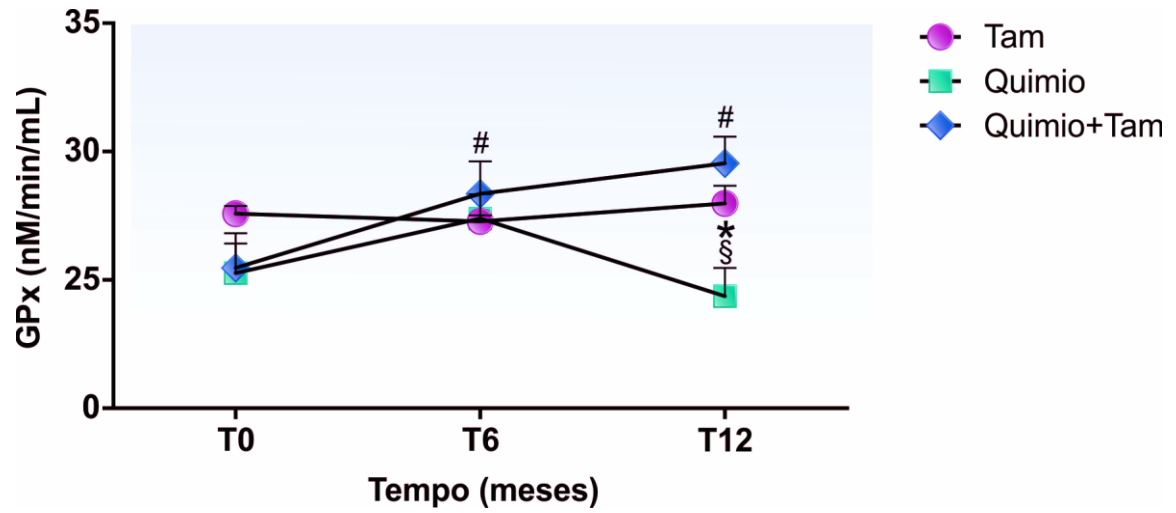


Figura 7. Atividade plasmática da GPx dos diferentes grupos durante os 12 meses de avaliação. # $p < 0,05$, comparado com T0; § $p < 0,05$, comparado com T6; * $p < 0,05$, comparado com os grupos Tam e Químio+Tam.

5. DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que mulheres em tratamento quimioterápico apresentaram aumento dos níveis circulantes de cTnI e AOPP, paralelos há uma redução da atividade plasmática da GPx, principalmente após seis meses do término do tratamento. Entretanto, mulheres que após o término da quimioterapia utilizaram hormonioterapia com o tamoxifeno, exibiram um aumento da atividade da GPx plasmática e mantiveram os níveis de cTnI e AOPP semelhantes ao início da pesquisa.

A despeito da complexidade na determinação dos riscos cardiovasculares a que estão expostos os pacientes tratados com quimioterápicos a base de antraciclinas, inúmeras evidências apontam que o aumento do estresse oxidativo seja o responsável pela lesão dos cardiomiócitos (GEISBERG, SAWYER, 2010). Diante disto, pode-se observar que mulheres com diagnóstico positivo de câncer de mama, submetidas apenas ao protocolo de quimioterapia, prévia ou adjuvantes, apresentaram ao final da pesquisa concentrações plasmáticas de cTnI maiores do que as submetidas à hormonioterapia profilática com tamoxifeno. No entanto, é importante salientar que as concentrações de cTnI de todos os grupos encontravam-se dentro dos valores normais para indivíduos. Este fato suscita a hipótese de que os efeitos cardioprotetores do tamoxifeno contra os danos causados pela quimioterapia no sistema cardiovascular possam estar envolvidos em mecanismos de longo prazo.

Sawaya et al. (2012), em seu estudo correlacionando os níveis de cTnI ultrasensível e imagens de ecocardiograma puderam constatar que dentre 81 pacientes com câncer de mama, tratadas com quimioterapia durante quinze meses, em 32% a cTnI foi capaz de prever danos cardíacos subsequentes ao tratamento, como por exemplo a redução na tensão sistólica longitudinal do miocárdio e conseqüentemente redução da FEVE. Em um estudo com 703 pacientes submetidos a quimioterapia com antraciclinas, acompanhados por pelo menos um ano após o término do tratamento, observou-se que 63 pessoas que possuíam maiores concentrações de cTnI durante a quimioterapia e após um mês de seu término eram mais propensas a eventos cardíacos deletérios (CARDINALE et al., 2004). Ewer e Ewer (2010) inferem que o uso das antraciclinas é um fator de risco para cardiotoxicidade pós-tratamento, em que

a elevação dos níveis de cTnI, mesmo em pacientes com FEVE normal, revela um dano progressivo dos cardiomiócitos. Já Cardinale et al. (2000), destacaram que uma pequena parcela dos pacientes cuja as concentrações de cTnI apresentavam-se normais também formam capazes de desenvolver disfunção ventricular transitória, caracterizada por uma FEVE reduzida. Apesar disto, há uma escassez de estudos que correlacionam as concentrações de cTnI e o uso de tamoxifeno.

A maioria dos trabalhos que avaliaram os efeitos cardiovasculares do tamoxifeno apontam os efeitos cardioprotetores da hormonioterapia por meio da modulação do perfil lipídico e de marcadores inflamatórios (CUSHMAN et al., 2001; HAYES et al., 2010; MAUREA et al., 2010). No entanto, em nenhum destes estudos foi abordado a participação do tamoxifeno após a quimioterapia e suas repercussões no sistema cardiovascular. Já nossos dados de concentrações séricas de cTnI (biomarcador de lesão cardíaca) corroboram com estudos prévios de nosso laboratório onde demonstramos que as mulheres em tratamento profilático com tamoxifeno exibiam maiores concentrações de apolipoproteína A em relação a apolipoproteína B e uma redução dos níveis plasmáticos de PCR, importantes marcadores de risco cardiovascular (ROMERO et al., 2012).

Diferente do tratamento quimioterápico exclusivo, não foram detectadas mudanças nas concentrações de cTnI nas pacientes tratadas com quimioterapia e hormonioterapia durante toda pesquisa, o que talvez possa ser devido ao início da hormonioterapia com tamoxifeno por parte de algumas voluntárias que já haviam terminado as sessões de quimioterapia no período anterior ao sexto mês de coleta das amostras.

A cardiotoxicidade decorrente dos tratamentos antineoplásicos a base de antraciclinas é um parâmetro importante no prognóstico terapêutico que tem impulsionado investigações experimentais e clínicas a entender seus mecanismos e estabelecer melhores condutas. Índícios apontam que o estresse oxidativo é uma das bases que compõem a fisiopatologia dos efeitos colaterais destes tratamentos (ROCA-ALONSO et al., 2012; STĚRBA et al., 2013). Neste âmbito a AOPP mostrou ser um biomarcador de estresse oxidativo sensível aos diferentes protocolos terapêuticos para o câncer de mama e possivelmente participa nos riscos cardiovasculares advindo dos mesmos. Mulheres submetidas exclusivamente ao tratamento com tamoxifeno, ao término da

pesquisa, apresentavam concentrações plasmáticas de AOPP menores do que as que se submeteram à quimioterapia. E destas, as que incorporaram o tamoxifeno após a quimioterapia os níveis plasmáticos de AOPP foram menores do que aquelas submetidas exclusivamente à quimioterapia. Provavelmente estes resultados sejam decorrentes da ação antioxidante do tamoxifeno, agindo como um *scavenger* das ERO e reduzindo a oxidação proteica desencadeada pela quimioterapia. Mosquera et al. (2014) inferem que o tamoxifeno deflagra respostas anti-inflamatórias e antioxidantes, por meio dos receptores de estrogênio alfa, reduzindo a citotoxicidade e morte celular. Paralelamente, Valente et al. (2013) constataram que as concentrações de AOPP estão diretamente envolvidas na morte de cardiomiócitos *in vitro* e que possivelmente estejam envolvidas nas lesões cardíacas em *in vivo*. No entanto, não foi encontrada nenhuma publicação que tenha correlacionado os efeitos dos quimioterápicos e hormonioterápicos com os níveis de AOPP e os riscos cardiovasculares, ao que indicar ser este trabalho o primeiro.

Não podemos deixar de notar que embora as mulheres que fizeram uso do tamoxifeno após a quimioterapia exibiam níveis de AOPP menores do que as que tratadas exclusivamente com quimioterapia, ainda assim seus níveis de AOPP foram maiores do que aquelas tratadas unicamente com o tamoxifeno. Em parte, pode-se especular este resultado no fato de que as mulheres que fazem o uso exclusivo do tamoxifeno não foram expostas ao estresse oxidativo mediado pela quimioterapia, mas que no entanto a hormonioterapia prescrita aquelas submetidas previamente à quimioterapia de alguma forma manteve os níveis de AOPP estáveis durante toda a pesquisa. Ou ainda, acreditamos ser possível que a oxidação proteica seja um parâmetro bioquímico sensível aos efeitos residuais da quimioterapia, mesmo frente a um fármaco com potencial efeito antioxidante. Perik et al. (2006), inferiram que o regime quimioterápico baseado em antraciclinas provou ser capaz de elevar a concentração plasmática de proteínas apoptóticas em mulheres com câncer de mama por um período de seis anos após o início do tratamento. Vera-Ramirez et al. (2011), consideraram que o tratamento quimioterápico com antraciclinas e/ou taxanos produz um certo nível de estresse oxidativo sistêmico que se mantém ao longo de todo tratamento, correlacionando-se com níveis elevados de proteínas oxidadas e danos ao DNA, o que poderiam influenciar negativamente na evolução clínica de mulheres

com câncer de mama e que as mulheres submetidas à hormonioterapia possuíam uma maior sobrevida livre de doença.

Outro importante resultado encontrado em nosso estudo foi que a isoforma plasmática da enzima antioxidante GPx foi suscetível a ação da hormonioterapia com tamoxifeno após a quimioterapia, quando detectamos um aumento de sua atividade seis meses após o início do tratamento o qual se manteve até o décimo segundo mês. Mais uma vez nossos dados corroboram com a hipótese dos efeitos agonistas estrogênicos do tamoxifeno sob o sistema antioxidante.

Estudos populacionais têm observado que mulheres no período fértil possuem uma concentração e atividade da GPx plasmática maior do que os homens e que isso provavelmente se dá por meio da ação dos estrógenos (RUSH, SANDIFORD, 2003; HO et al., 2005). De fato, foi descrito que o estrogênio possui uma relação reguladora na expressão da GPx plasmática (O'LONE et al., 2007), e que em cultura de células, o estrogênio foi capaz de aumentar a expressão de enzimas antioxidantes, como a GPx e SOD, por meio de vias de sinalização intracelular ERK, MAPK e fator de transcrição kappa-B, (VINA et al., 2011). De igual forma, o uso de fitoestrógenos, como os derivados do cogumelo *Agaricus blazei Murril*, é capaz de estimular a síntese de GPx3, prevenindo os danos vasculares oxidativos da aterosclerose (DONG et al., 2012). Já em um estudo experimental *in vivo*, envolvendo a isquemia miocárdica por reperfusão, observou que os animais tratados com tamoxifeno mantiveram as concentrações plasmáticas de glutatona e GPx, enquanto foi observado uma queda dos mesmos parâmetros e uma elevação de malondialdeído (produto de peroxidação lipídica) e creatinina kinase (marcador de lesão miocárdica) no grupo controle (EK et al., 2008). Mediante estas evidências, associadas aos nossos dados, julgamos ser possível a influência da hormonioterapia na manutenção da atividade antioxidante da GPx em mulheres tratadas com tamoxifeno após a quimioterapia.

Divergentemente, estudos que avaliaram o desenvolvimento de resistência terapêutica em células tumorais da mama, correlacionaram seus resultados com um aumento da expressão da GPx em resposta a quimioterapia (JARDIM et al., 2013) e uma redução da atividade da GPx mediante o tratamento com tamoxifeno ou em combinação com o estrogênio (SINGH, BHAT, BHAT, 2011), não obstante ambos

estudos não fizeram correlações com DCV e avaliaram a isoforma citosólica da enzima.

Embora a atividade da GPx nas mulheres tratadas com quimioterapia apenas não mostre diferença em relação as que fizeram o uso do tamoxifeno após a quimioterapia após seis meses do início do tratamento, acredita-se que este resultado possa estar relacionado com os mecanismos fisiológicos de defesa do organismo. Este fato pode ser evidenciado pela observação feita em pacientes submetidos a quimioterapia e suplementação nutricional parenteral após transplante de medula, em que estes também demonstraram um aumento progressivo da atividade da GPx correlacionada como uma resposta fisiológica de defesa antioxidante (JONAS, 2000).

Observamos também que na terapia exclusiva com quimioterápicos há um declínio significativo da atividade da GPx após seis meses do término do protocolo quimioterápico (T12), comparados a mulheres que fizeram uso do tamoxifeno após a quimioterapia. Possivelmente, tais resultados devem-se ao fato dos efeitos crônicos residuais da quimioterapia, o que incrementa a preocupação consensual em relação aos efeitos cardiotoxicos das antraciclinas. Shiomi et al. (2004), avaliaram que o aumento da expressão da GPx atenua a redução da FEVE e é inversamente proporcional ao remodelamento cardíaco em modelos experimentais de infarto. Mercurio et al. (2007), descreveram uma associação entre a redução da concentração de GPx, aumento da citocina pró-inflamatória IL-6 e alterações nas imagens de ecocardiograma de pacientes tratados com antraciclinas, e suscitaram a hipótese de que anomalias cardíacas leves podem ocorrer a níveis cumulativos da droga, mesmo em baixas doses. Recentemente a atividade plasmática reduzida da GPx foi inversamente e linearmente correlacionada com a mortalidade por doenças cardiovasculares (incluindo doença cardíaca coronária, outra doença aterosclerótica e acidente vascular cerebral) em indivíduos com baixa lipoproteínas de alta densidade, de forma independente dos fatores de risco convencionais (BUIJSSE et al., 2012).

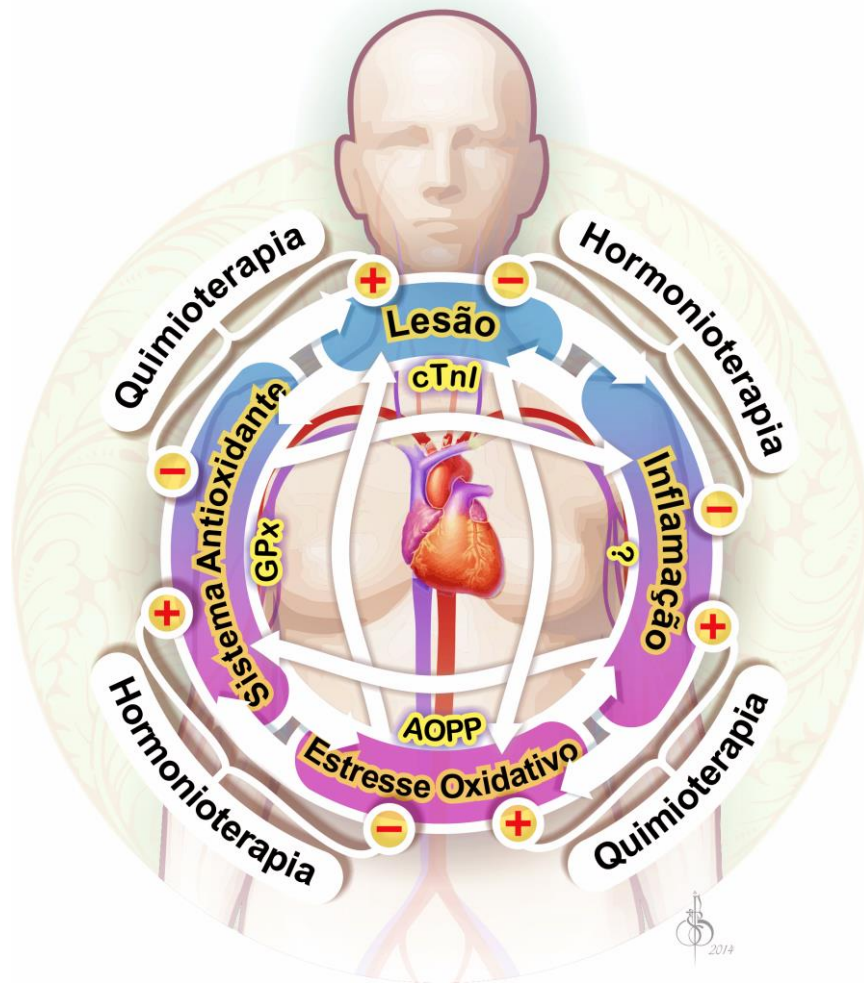
De fato, a correlação entre o prognóstico do câncer e os níveis de GPx plasmática é um dado ainda muito controverso na literatura, como observou Brigeliu-Forhé e Maiorino (2013). Estes autores, no entanto, também inferiram que nos processos

inflamatórios há um *up-regulation* da isoforma plasmática da GPx como uma resposta protetora do organismo.

Nossos achados indicam uma possível relação de causa e efeito nos danos e proteção articulados pela quimioterapia e a hormonioterapia, respectivamente. Embora esta pesquisa não tenha apresentado dados sobre inflamação, à luz de outros trabalhos acreditamos que em meio a elevação progressiva dos níveis de AOPP e a estaticidade da atividade da GPx em mulheres tratadas apenas com quimioterapia (coexistentes a não alteração dos níveis de AOPP e a dinâmica da atividade da GPx das mulheres tratadas com quimioterapia e hormonioterapia) a resposta inflamatória possa ser um componente ativo neste processo. Várias pesquisas têm demonstrado uma correlação entre inflamação e o estresse oxidativo em doenças ateroscleróticas (SCHWEDLER et al., 2006; CUSTODIS et al., 2010; CARDINALE, CIPOLLA, 2011; OIKONOMOU et al., 2011;). Mais precisamente, Liu et al. (2006), ressaltam uma relação entre o aumento dos níveis plasmáticos de AOPP e o fator de necrose tumoral alfa e uma redução da atividade da GPx em um modelo experimental de aterosclerose.

De fato, a complexidade das interações bioquímicas nos processos fisiopatológicos é um desafio para definição dos riscos à saúde aos que são submetidos a algum dos tratamentos antineoplásicos. As características da doença, a não seletividade dos fármacos e seu potencial oxidativo, aliados à fatores de risco inerentes e possíveis comorbidades de cada pessoa formam uma teia onde os danos e respostas imunes de defesa possuem limites tênues no desenvolvimento da DCV. O próprio termo estresse oxidativo pode ser questionado quando se pensa que o aumento da produção das espécies reativas possa ser uma resposta a agressão sofrida pela célula e não a fonte (NAVIAUX, 2012).

Diante dos resultados encontrados, a ilustração abaixo mostra as interações entre lesão tecidual, estresse oxidativo e atividade antioxidante, bem como a possível interconexão com a resposta inflamatória a que estão sujeitas mulheres em tratamento do câncer de mama.



6. CONCLUSÃO

Mulheres com câncer de mama submetidas às terapias antineoplásicas a base de antraciclinas, apresentaram após seis meses do término do tratamento quimioterápico (T12) uma maior concentração de Tnl e AOPP e uma menor atividade da isoforma plasmática da GPx, quando comparadas às mulheres tratadas exclusivamente com tamoxifeno ou que o incorporaram após o tratamento quimioterápico. Frente às evidências, esta pesquisa configurou-se como uma continuidade dos trabalhos sobre a avaliação dos riscos cardiovasculares em mulheres submetidas aos tratamentos do câncer de mama, entendendo que um monitoramento dos riscos de doenças não relacionadas ao câncer de mama, em especial as DCV, configura-se não apenas como importante, mas uma premissa necessária na gestão das condutas terapêuticas e adoção de políticas públicas, no intuito de alcançar resultados mais efetivos do tratamento. No entanto, dado ao tamanho da amostra em interface com a importante natureza bioquímica dos biomarcadores, julgamos necessário mais estudos sobre o tema.

7. REFERÊNCIAS

ALI, S.; BULUWELA, L.; COOMBES, R. C. Antiestrogens and their therapeutic applications in breast cancer and other diseases. *Annual review of medicine*, v. 62, n. October 2010, p. 217–32, jan. 2011.

ALPERT, J. S.; THYGESEN, K. Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *European heart journal*, v. 21, n. 18, p. 1502–13, set. 2000.

ATALAY, G. The effect of exemestane on serum lipid profile in postmenopausal women with metastatic breast cancer: a companion study to EORTC Trial 10951, 'Randomized phase II study in first line hormonal treatment for metastatic breast cancer with exemestane or tamoxifen'. *Annals of Oncology*, v. 15, n. 2, p. 211–17, fev. 2004.

BACCIN, A. C.; SARTORI, J.; MANFREDINI, V. Efeito do Tratamento com Tamoxifeno sobre o Hemograma e Lipidograma de Mulheres Diagnosticadas com Câncer de Mama. *NewsLab*, v. 106, p. 198–206, 2011.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios Oxidative stress: concept, implications. *Rev. Nutr.*, v. 23, n. 4, p. 629–43, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quimica Nova*, v. 29, n. 1, p. 113–23, 2006.

BEHJATI, S.; FRANK, M. H. The effects of tamoxifen on immunity. *Current medicinal chemistry*, v. 16, n. 24, p. 3076–80, jan. 2009.

BONANNI, B. et al. Effect of tamoxifen at low doses on ultrasensitive C-reactive protein in healthy women. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, v. 1, n. 10, p. 2149–52, out. 2003.

BOVELLI, D.; PLATANIOTIS, G.; ROILA, F. Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents and radiotherapy-related heart disease: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, v. 21, Suppl 5, p. v277–82, maio 2010.

BRANDOLT, G. L. L. Estudo da toxicidade da capecitabina em pacientes idosos com câncer de mama e do trato gastrointestinal. [s.l.] Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2008.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; MAIORINO, M. Glutathione peroxidases. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1830, n. 5, p. 3289–303, maio 2013.

BUIJSSE, B. et al. Low serum glutathione peroxidase activity is associated with increased cardiovascular mortality in individuals with low HDLc's. *PloS one*, v. 7, n. 6, p. e38901, jan. 2012.

CARDINALE, D. et al. Left ventricular dysfunction predicted by early troponin I release after high-dose chemotherapy. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 36, n. 2, p. 517–22, ago. 2000.

CARDINALE, D. et al. Myocardial injury revealed by plasma troponin I in breast cancer treated with high-dose chemotherapy. *Annals of Oncology*, v. 13, n. 5, p. 710–15, maio 2002.

CARDINALE, D. et al. Prognostic value of troponin I in cardiac risk stratification of cancer patients undergoing high-dose chemotherapy. *Circulation*, v. 109, n. 22, p. 2749–54, jun. 2004.

CARDINALE, D.; CIPOLLA, C. M. Assessment of cardiotoxicity with cardiac biomarkers in cancer patients. *Herz*, v. 36, n. 4, p. 325–32, jun. 2011.

CARVALHO, R. A. et al. Metabolic remodeling associated with subchronic doxorubicin cardiomyopathy. *Toxicology*, v. 270, n. 2-3, p. 92–8, abr. 2010.

CHAPMAN, J. W. et al. Competing Causes of Death From a Randomized Trial of Extended Adjuvant Endocrine Therapy for Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst*, v. 100, n. 4, p. 252–60, 2009.

CHARGARI, C. et al. Cardiac toxicity in breast cancer patients: from a fractional point of view to a global assessment. *Cancer treatment reviews*, v. 37, n. 4, p. 321–30, jun. 2011.

CRISCITIELLO, C. et al. Tamoxifen in early-stage estrogen receptor-positive breast cancer: overview of clinical use and molecular biomarkers for patient selection. *OncoTargets and therapy*, v. 4, p. 1–11, jan. 2011.

CUSHMAN, M. et al. Tamoxifen and Cardiac Risk Factors in Healthy Women : Suggestion of an Anti-inflammatory Effect. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 21, n. 2, p. 255–61, fev. 2001.

CUSTODIS, F. et al. Vascular pathophysiology in response to increased heart rate. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 56, n. 24, p. 1973–83, dez. 2010.

DONG, S. et al. Estrogen-like activity and dual roles in cell signaling of an *Agaricus blazei* Murrill mycelia-dikaryon extract. *Microbiological research*, v. 167, n. 4, p. 231–7, abr. 2012.

DU, X. L.; FOX, E. E.; LAI, D. Competing Causes of Death for Women With Breast Cancer and Change Over Time From 1975 to 2003. *Am J Clin Oncol*, v. 31, n. 2, p. 105–16, 2008.

EILERTSEN, A. L. et al. Differential impact of conventional-dose and low-dose postmenopausal hormone therapy, tibolone and raloxifene on C-reactive protein and other inflammatory markers. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, v. 6, n. 6, p. 928–34, jun. 2008.

EK, R. O. et al. Effects of tamoxifen on myocardial ischemia-reperfusion injury model in ovariectomized rats. *Molecular and cellular biochemistry*, v. 308, n. 1-2, p. 227–35, jan. 2008.

EVANS, P.; HALLIWELL, B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *The British journal of nutrition*, v. 85 Suppl 2, p. S67–S74, maio 2001.

EWER, M. S.; EWER, S. M. Troponin I provides insight into cardiotoxicity and the anthracycline-trastuzumab interaction. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, v. 28, n. 25, p. 3901–4, set. 2010.

FORYST-LUDWIG, A.; KINTSCHER, U. Metabolic impact of estrogen signalling through ERalpha and ERbeta. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, v. 122, n. 1-3, p. 74–81, out. 2010.

GEISBERG, C. A.; SAWYER, D. B. Mechanisms of anthracycline cardiotoxicity and strategies to decrease cardiac damage. *Current hypertension reports*, v. 12, n. 6, p. 404–10, dez. 2010.

GODOY, M. F. DE; BRAILE, D. M.; NETO, J. P. A Troponina como Marcador de Injúria Celular Miocárdica. *Arq Bras Cardiol*, v. 71, n. no 4, p. 629–33, 1998.

HAYES, D. F. et al. Estrogen receptor genotypes, menopausal status, and the effects of tamoxifen on lipid levels: revised and updated results. *Clinical pharmacology and therapeutics*, v. 88, n. 5, p. 626–9, nov. 2010.

HEIDE, R. S. VANDER; L'ECUYER, T. J. Molecular basis of anthracycline- induced cardiotoxicity. *Heart and Metabolism*, v. 35, n. 2, p. 1–4, 2007.

HERON, M. National Vital Statistics Reports Deaths : Leading Causes for 2010. *National Vital Statistics Reports*, v. 62, n. 6, p. 1–97, 2013.

HERSHMAN, D. L.; NEUGUT, A. I. Anthracycline cardiotoxicity: one size does not fit all! *Journal of the National Cancer Institute*, v. 100, n. 15, p. 1046–7, 6 ago. 2008.

HO, S. P. et al. Antioxidant enzyme activities in healthy Chinese adults: influence of age, gender and smoking. *Respirology (Carlton, Vic.)*, v. 10, n. 3, p. 305–9, jun. 2005.

INCA. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. 1. ed. Rio de Janeiro: Flama, 2014. p. 122

JARDIM, B. V. et al. Glutathione and glutathione peroxidase expression in breast cancer: An immunohistochemical and molecular study. *Oncology Reports*, v. 30, n. 3, p. 1119–28, set. 2013.

JJI, R. S.; KRAMER, C. M.; SALERNO, M. Non-invasive imaging and monitoring cardiotoxicity of cancer therapeutic drugs. *J Nucl Cardiol*, v. 19, n. 2, p. 377–88, 2012.

JONAS, C. R. et al. Plasma antioxidant status after high-dose chemotherapy: a randomized trial of parenteral nutrition in bone marrow transplantation patients. *The American journal of clinical nutrition*, v. 72, n. 1, p. 181–9, 2000.

JONES, L. W. et al. Cardiovascular reserve and risk profile of postmenopausal women after chemoendocrine therapy for hormone receptor-positive operable breast cancer. *The oncologist*, v. 12, n. 10, p. 1156–64, out. 2007.

KALIL FILHO, R. et al. I Diretriz Brasileira de Cardio-Oncologia da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 96, n. 2 supl. 1, p. 1–52, 2011.

KUROKAWA, S. et al. Progression of ventricular remodeling and arrhythmia in the primary hyperoxidative state of glutathione-depleted rats. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*, v. 75, n. 6, p. 1386–93, 2011.

KY, B.; CARVER, J. R. Biomarker approach to the detection and cardioprotective strategies during anthracycline chemotherapy. *Heart failure clinics*, v. 7, n. 3, p. 323–31, jul. 2011.

LIU, S. X. et al. Advanced oxidation protein products accelerate atherosclerosis through promoting oxidative stress and inflammation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, v. 26, n. 5, p. 1156–62, maio 2006.

MACHADO, V. et al. O Carvedilol como protector da cardiotoxicidade induzida pelas Antraciclinas (Doxorrubicina). *Rev Port Cardiol*, v. 27, n. 7, p. 1277–96, jul. 2008.

MARKOPOULOS, C. J. Minimizing early relapse and maximizing treatment outcomes in hormone-sensitive postmenopausal breast cancer: efficacy review of AI trials. *Cancer metastasis reviews*, v. 29, n. 4, p. 581–94, dez. 2010.

MAUREA, N. et al. Women survive breast cancer but fall victim to heart failure: the shadows and lights of targeted therapy. *Journal of cardiovascular medicine* (Hagerstown, Md.), v. 11, n. 12, p. 861–8, dez. 2010.

MEINARDI, M. T. et al. Detection of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Cancer treatment reviews*, v. 25, n. 4, p. 237–47, ago. 1999.

MERCURO, G. et al. Early epirubicin-induced myocardial dysfunction revealed by serial tissue Doppler echocardiography: correlation with inflammatory and oxidative stress markers. *The Oncologist*, v. 12, n. 9, p. 1124–33, set. 2007.

MONTERA, V. DOS S. P. Benefícios dos Nutrientes Antioxidantes e seus Cofatores no Controle do Estresse Oxidativo e Inflamação na Insuficiência Cardíaca. *Rev. SOCERJ*, v. 20, n. 1, p. 20–7, 2007.

MORRIS, P. G. et al. Troponin I and C-reactive protein are commonly detected in patients with breast cancer treated with dose-dense chemotherapy incorporating trastuzumab and lapatinib. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, v. 17, n. 10, p. 3490–9, maio 2011.

MOSCA, L. et al. Evidence-based guidelines for cardiovascular disease prevention in women: 2007 update. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 49, n. 11, p. 1230–50, mar. 2007.

MOSQUERA, L. et al. Tamoxifen and estradiol improved locomotor function and increased spared tissue in rats after spinal cord injury: Their antioxidant effect and role of estrogen receptor alpha. *Brain research*, v. 1561, n. 1, p. 11-22. 2014.

MYERS, G. L. et al. *Emerging Biomarkers for Primary Prevention of Cardiovascular Disease and Stroke*. 1. ed. Washington: American Association for Clinical Chemistry, 2009. p. 65.

NATHAN, F. M. et al. Oxidative stress and antioxidant status in primary bone and soft tissue sarcoma. *BMC Cancer*, v. 11, n. 1, p. 382–89, jan. 2011.

NAVIAUX, R. K. Oxidative shielding or oxidative stress? *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, v. 342, n. 3, p. 608–18, set. 2012.

NELSON, H. D. et al. Use of medications to reduce risk for primary breast cancer: a systematic review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Annals of internal medicine*, v. 158, n. 8, p. 604–14, abr. 2013.

O'LONE, R. et al. Estrogen receptors alpha and beta mediate distinct pathways of vascular gene expression, including genes involved in mitochondrial electron transport and generation of reactive oxygen species. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, v. 21, n. 6, p. 1281–96, jun. 2007.

OIKONOMOU, E. et al. Review Article The Role of Inflammation in Heart Failure: New Therapeutic Approaches. *Hellenic Journal of Cardiology*, v. 52, n. 1, p. 30–40, 2011.

OLSZANECKA, A. et al. Subclinical organ damage in perimenopausal women with essential hypertension. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*, v. 120, n. 10, p. 390–8, out. 2010.

PERIK, P. J. et al. Circulating apoptotic proteins are increased in long-term disease-free breast cancer survivors. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*, v. 45, n. 2, p. 175–83, jan. 2006.

PIERCE, B. L. et al. Correlates of circulating C-reactive protein and serum amyloid A concentrations in breast cancer survivors. *Breast cancer research and treatment*, v. 114, n. 1, p. 155–67, mar. 2009.

ROCA-ALONSO, L. et al. Breast cancer treatment and adverse cardiac events: what are the molecular mechanisms? *Cardiology*, v. 122, n. 4, p. 253–9, jan. 2012.

ROMERO, W. et al. Tamoxifen Alters the Plasma Concentration of Molecules Associated with Cardiovascular Risk in Women with Breast Cancer Undergoing Chemotherapy. *The oncologist*, v. 17, n. 4, p. 499–507, 2012.

ROONGSRITONG, C.; WARRAICH, I.; BRADLEY, C. Common Causes of Troponin Elevations in the Absence of Acute Myocardial Infarction: Incidence and Clinical Significance. *CHEST Journal*, v. 125, n. 5, p. 1877–84, maio 2004.

RUSH, J. W. E.; SANDIFORD, S. D. Plasma glutathione peroxidase in healthy young adults: influence of gender and physical activity. *Clinical biochemistry*, v. 36, n. 5, p. 345–51, jul. 2003.

SAWAYA, H. et al. Assessment of echocardiography and biomarkers for the extended prediction of cardiotoxicity in patients treated with anthracyclines, taxanes, and trastuzumab. *Circulation. Cardiovascular imaging*, v. 5, n. 5, p. 596–603, set. 2012.

SCHWEDLER, S. B. et al. C-reactive protein: a family of proteins to regulate cardiovascular function. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*, v. 47, n. 2, p. 212–22, fev. 2006.

SHIOMI, T. et al. Overexpression of glutathione peroxidase prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice. *Circulation*, v. 109, n. 4, p. 544–9, fev. 2004.

SINGH, B.; BHAT, N. K.; BHAT, H. K. Partial inhibition of estrogen-induced mammary carcinogenesis in rats by tamoxifen: balance between oxidant stress and estrogen responsiveness. *PloS one*, v. 6, n. 9, p. e25125, jan. 2011.

SOUZA, H. C. D.; TEZINI, G. C. S. V. Autonomic Cardiovascular Damage during Post-menopause: the Role of Physical Training. *Aging and disease*, v. 4, n. 6, p. 320–8, jan. 2013.

STĚRBA, M. et al. Oxidative stress, redox signaling, and metal chelation in anthracycline cardiotoxicity and pharmacological cardioprotection. *Antioxidants & redox signaling*, v. 18, n. 8, p. 899–929, mar. 2013.

THORBURN, A.; FRANKEL, A. E. Apoptosis and anthracycline cardiotoxicity. *Molecular cancer therapeutics*, v. 5, n. 2, p. 197–9, fev. 2006.

THULER, L. C. Considerações sobre a prevenção do câncer de mama feminino Considerations on the prevention of female breast cancer. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 49, n. 4, p. 227–38, 2003.

VALENTE, A. J. et al. Advanced oxidation protein products induce cardiomyocyte death via Nox2/Rac1/superoxide-dependent TRAF3IP2/JNK signaling. *Free Radic Biol Med.*, v. 60, n. 7, p. 125–35, 2013.

VERA-RAMIREZ, L. et al. Does chemotherapy-induced oxidative stress improve the survival rates of breast cancer patients? *Antioxidants & redox signaling*, v. 15, n. 4, p. 903–9, 15 ago. 2011.

VERMA, S.; EWER, M. S. Is cardiotoxicity being adequately assessed in current trials of cytotoxic and targeted agents in breast cancer? *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, v. 22, n. 5, p. 1011–8, maio 2011.

VINA, J. et al. Females live longer than males: role of oxidative stress. *Current pharmaceutical design*, v. 17, n. 36, p. 3959–65, dez. 2011.

WHO. *Women and health: today's evidence tomorrow's agenda*. 1. ed. Geneva: WHO Press, 2009. p. 91.

ZHAO, Y. et al. Nox2 NADPH oxidase promotes pathologic cardiac remodeling associated with Doxorubicin chemotherapy. *Cancer research*, v. 70, n. 22, p. 9287–97, nov. 2010.