



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

AIMÉE OBOLARI DURÇO

**EFEITO CARDIOPROTETOR DO COMPLEXO DE INCLUSÃO D-LIMONENO
HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA NA CARDIOTOXICIDADE INDUZIDA POR
DOXORRUBICINA EM MODELO ANIMAL**

ARACAJU - SE

2024

AIMÉE OBOLARI DURÇO	EFEITO CARDIOPROTECTOR DO COMPLEXO DE INCLUSÃO D-LIMONENO HIDROXIPROPIL-β-CICLODEXTRINA NA CARDIOTOXICIDADE INDUZIDA POR DOXORRUBICINA EM MODELO ANIMAL	2024

AIMÉE OBOLARI DURÇO

**EFEITO CARDIOPROTETOR DO COMPLEXO DE INCLUSÃO D-LIMONENO
HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA NA CARDIOTOXICIDADE INDUZIDA POR
DOXORRUBICINA EM MODELO ANIMAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Roberto Viana dos Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Danilo Roman Campos

ARACAJU – SE

2024

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA SAÚDE – BISAU
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

D953e	Durço, Aimée Obolari Efeito cardioprotetor do complexo de inclusão D-Limoneno Hidroxipropil-β-Ciclodextrina na cardiotoxicidade induzida por doxorubicina em modelo animal / Aimée Obolari Durço ; orientador Márcio Roberto Viana dos Santos ; coorientador Danilo Roman Campos. – Aracaju, 2024. 116 f. : il. Tese (doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, 2024. 1. Ciências da saúde. 2. Cardiotoxicidade. 3. Doxorubicina. 4. D-limoneno. 5. Ciclodextrina. 6. CaMKII. I. Santos, Márcio Roberto Viana dos, orient. II. Campos, Danilo Roman, coorient. III. Título. CDU 612.174
-------	---

AIMÉE OBOLARI DURÇO
EFEITO CARDIOPROTETOR DO COMPLEXO DE INCLUSÃO D-LIMONENO
HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA NA CARDIOTOXICIDADE INDUZIDA POR
DOXORRUBICINA EM MODELO ANIMAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Aprovada em: ____/____/____

Orientador: Prof. Dr. Márcio Roberto Viana dos Santos
Universidade Federal de Sergipe

1º Examinador: Prof. Dr. André Sales Barreto
Universidade Federal de Sergipe

2º Examinador: Prof^a. Dr^a. Carla Maria Lins de Vasconcelos
Universidade Federal de Sergipe

3º Examinador: Prof. Dr. Fabricio Nunes Macedo
Centro Universitário Maurício de Nassau

4º Examinador: Prof^a. Dr^a. Jullyana de Souza Siqueira Quintans
Universidade Federal de Sergipe

PARECER

Dedicatória

Ao meu pai, Paulo, por fazer da leitura uma “obrigação” na infância que levou ao gosto pro resto da vida

À minha mãe, Maria, que mesmo diante das dificuldades declarou em alto e bom tom: “a minha filha vai fazer faculdade sim!”

Às minhas irmãs, Cabeça e Leléu, que fizeram e fazem valer o espírito das “3 mosqueteiras”

Ao meu marido, Diego, que corajosamente “mudou a vida” rumo ao que sempre quis profissionalmente e me deu a valentia de fazer o mesmo

Ao meu “vô Rael” (Israel), que me ensinou a cantar a tabuada e fazer continha de dividir

À minha avó, Elzira (*in memoriam*), que levava consigo (quase) todos os segredos das plantas medicinais e me mostrou em primeira mão o “poder delas”

À minha filha de quatro patas, Marie Curie, capaz de “curar” todas as mazelas da vida num único olhar

Amo vocês.

Agradecimentos

À Jeová Deus.

Ao meu marido, Diego, que sempre me ajudou e esteve comigo; seu apoio e críticas (mesmo que às vezes eu não gostasse rsrsrs) foram e são de valia inestimável.

À minha família e à família do meu marido, em especial à minha sogra Alana e à tia Alba.

Ao meu orientador, Prof. Márcio Viana, que sempre esteve presente durante essa jornada, me desafiou intelectualmente, me corrigiu e me elogiou, contribuindo sobremaneira para a minha formação.

Ao meu coorientador, Prof. Danilo Roman, que me aceitou às cegas, simplesmente acreditou que eu conseguiria fazer o que disse que faria e me municiou com o necessário.

Ao querido Prof. Jader Cruz, pelas várias conversas que um incauto tomaria como informais, mas que verdadeiramente estavam imbuídas de reflexões científicas-filosóficas. Agradeço também por generosamente ter aberto as portas de seu laboratório e, devido a um esquema semi-insano de experimentos, ter ido à bancada.

Aos amigos Paula Rhana e Rodrigo Miguel, por terem me aturado tanto com os questionamentos sobre o famigerado blot.

Aos professores e colegas dos Laboratórios de CardioBiologia (Unifesp), Membranas Excitáveis (UFMG), Farmacologia Cardiovascular (UFS), Biofísica do Coração (UFS) e tantos outros laboratórios que ajudaram não apenas com equipamentos ou reagentes, mas principalmente com as pessoas. Ah! E como eu encontrei boas pessoas pelo caminho!

Às agências de fomento à pesquisa, CAPES e FAPESP (projeto FAPESP 2021/05584-7).

Aos animais que foram utilizados nesta pesquisa.

RESUMO

Introdução: A cardiotoxicidade (cdtx) induzida pela Doxorrubicina (Doxo) é um problema comum no tratamento do câncer, sendo este o principal fator limitante para seu uso na clínica por promover alterações cardíacas mecânicas e eletrocardiográficas; ainda assim, não existe um tratamento específico, que seja amplamente aceito, para a cdtx induzida por Doxo. Produtos naturais têm sido testados de maneira exitosa no tratamento para doenças cardiovasculares, mais especificamente, o monoterpeno D-limoneno (DL) foi testado com sucesso como agente cardioprotetor em modelos animais; no entanto, é volátil e tem baixa solubilidade em água, o que limita seu uso clínico. Assim, o complexo DL com hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD) poderia melhorar suas propriedades. O objetivo geral deste trabalho foi investigar, através de ensaio experimental, o efeito cardioprotetor do complexo de inclusão D-limoneno-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HβDL) na cdtx induzida por Doxo.

Métodos: Os animais foram divididos em grupos (n=5) e tratados, por via intraperitoneal, ou com DL (10 mg/kg), ou HβDL (10, 30 e 100 mg/kg), ou HPβCD (100 mg/kg), ou com veículo (NaCl 0,9%/DMSO 0,1%); a cdtx foi induzida com Doxo (20 mg/kg). Para avaliação de lesão cardíaca, CK-MB e LDH foram dosados no soro sanguíneo de todos os grupos. Para as demais avaliações como análise histológica, parâmetros eletrocardiográficos, suscetibilidade a arritmias *in vivo* e *in vitro*, potencial de ação (PA), corrente de cálcio tipo L ($I_{Ca,L}$), produção de espécies reativas de oxigênio citosólico e mitocondrial, massa mitocondrial, transiente de cálcio, contratilidade, atividade de enzimas antioxidantes, lipoperoxidação, expressão de quinase II dependente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII), Bax, Bcl2 e Caspase 3, foi utilizado HβDL 10 mg/kg. Docking molecular também foi realizado. Para a análise estatística utilizou-se ANOVA one-way/two-way, conforme o caso, ou o teste qui-quadrado, seguidos do teste post hoc de Bonferroni, sendo considerada significância quando $P < 0,05$.

Resultados: Os biomarcadores de lesão cardíaca CK-MB e LDH foram elevados no grupo Doxo em comparação com o controle, e foram revertidos por HβDL em todas as doses. Alterações histológicas de infiltrado celular e vacúolos apresentados no grupo Doxo foram prevenidos por HβDL. HβDL oportunizou ganho de peso corporal semelhante ao grupo controle. Parâmetros eletrocardiográficos de QTc, QRS e BPM estavam aumentados no grupo Doxo, o que foi prevenido no grupo HβDL; a arritmia *in vivo* foi 50% maior no grupo Doxo do que no grupo HβDL. Arritmia no PA, duração e desvio padrão médio do PA, amplitude do transiente e ondas de cálcio estavam aumentados no grupo Doxo, o que foi prevenido pelo HβDL. A $I_{Ca,L}$ estava aumentada no grupo Doxo, o que também foi prevenido por HβDL. O encurtamento sarcomérico e o tempo para relaxamento em 50% estavam reduzidos no grupo Doxo, e HβDL restaurou ambos os parâmetros. HβDL preveniu o fenótipo de aumento da expressão de CaMKII fosforilada e oxidada pela administração de Doxo, como também o aumento nas espécies reativas citoplasmática e mitocondrial e massa mitocondrial. As atividades da glutatona peroxidase e superóxido dismutase (SOD) mitocondrial, que estavam diminuídas no grupo Doxo foi restaurada no grupo HβDL. Não houve diferença nas atividades da catalase e SOD citoplasmática. HβDL impediu o aumento de proteínas pró-apoptóticas Bax e Caspase 3, e da lipoperaxidação, induzidos por Doxo. Não houve alteração na expressão de Bcl-2. O docking molecular exibiu afinidade entre DL e os dois ligantes avaliados – CaMKII e quinase da cadeia leve da miosina.

Conclusão: O HβDL 10 mg/kg preveniu o aumento em biomarcadores de lesão cardíaca e alterações estruturais no tecido cardíaco, melhorou perfil eletrocardiográfico, diminuiu percentual de arritmia *in vivo* e *in vitro*, reduziu ondas de cálcio, preveniu alterações no PA e na dinâmica de contração/relaxamento do cardiomiócito, impediu o aumento da $I_{Ca,L}$, inibiu ativação da CaMKII, melhorou perfil redox e suprimiu vias apoptóticas. Os resultados validam o desenho de estudo e mostram um potencial efeito cardioprotetor promissor do HβDL.

Descritores: cardiotoxicidade. Doxorrubicina. D-limoneno. Ciclodextrina. CAMKII.

ABSTRACT

Introduction: Cardiotoxicity (cdtx) induced by Doxorubicin (Doxo) is a common problem in the treatment of cancer, which is the main limiting factor for its use in the clinic as it promotes mechanical and electrocardiographic cardiac changes; Still, there is no specific, widely accepted treatment for Doxo-induced cdtx. Natural products have been successfully tested in the treatment of cardiovascular diseases, more specifically, the monoterpene D-limonene (DL) was successfully tested as a cardioprotective agent in animal models; however, it is volatile and has low solubility in water, which limits its clinical use. Thus, the DL complex with hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD) could improve its properties. The general objective of this work was to investigate, through experimental testing, the cardioprotective effect of the D-limonene-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (H β DL) inclusion complex on Doxo-induced cdtx.

Methods: The animals were divided into groups (n=5) and treated intraperitoneally with either DL (10 mg/kg), or H β DL (10, 30 and 100 mg/kg), or HP β CD (100 mg/kg), or with vehicle (0.9% NaCl/0.1% DMSO); cdtx was induced with Doxo (20 mg/kg). To assess cardiac injury, CK-MB and LDH were measured in the blood serum of all groups. For other assessments such as histological analysis, electrocardiographic parameters, susceptibility to arrhythmias in vivo and in vitro, action potential (AP), L-type calcium current (I_{Ca,L}), production of cytosolic and mitochondrial reactive oxygen species, mitochondrial mass, calcium transient, contractility, activity of antioxidant enzymes, lipoperoxidation, expression of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II (CaMKII), Bax, Bcl2 and Caspase 3, H β DL 10 mg/kg was used. Molecular docking was also performed. For statistical analysis, one-way/two-way ANOVA was used, as appropriate, or the chi-square test, followed by the Bonferroni post hoc test, with significance being considered when $P < 0.05$.

Results: Cardiac injury biomarkers CK-MB and LDH were elevated in the Doxo group compared to control, and were reversed by H β DL at all doses. Histological changes of cellular infiltrate and vacuoles presented in the Doxo group were prevented by H β DL. H β DL led to body weight gain similar to the control group. Electrocardiographic parameters of QTc, QRS and BPM were increased in the Doxo group, which was prevented in the H β DL group; in vivo arrhythmia was 50% higher in the Doxo group than in the H β DL group. AP arrhythmia, duration and mean standard deviation of AP, transient amplitude and calcium waves were increased in the Doxo group, which was prevented by H β DL. I_{Ca,L} was increased in the Doxo group, which was also prevented by H β DL. Sarcomeric shortening and time to relaxation by 50% were reduced in the Doxo group, and H β DL restored both parameters. H β DL prevented the phenotype of increased expression of phosphorylated and oxidized CaMKII by Doxo administration, as well as the increase in cytoplasmic and mitochondrial reactive species and mitochondrial mass. The activities of mitochondrial glutathione peroxidase and superoxide dismutase (SOD), which were decreased in the Doxo group, were restored in the H β DL group. There was no difference in catalase and cytoplasmic SOD activities. H β DL prevented the increase in pro-apoptotic proteins Bax and Caspase 3, and lipoperoxidation, induced by Doxo. There was no change in Bcl-2 expression. Molecular docking showed affinity between DL and the two ligands evaluated – CaMKII and myosin light chain kinase.

Conclusion: H β DL 10 mg/kg prevented the increase in biomarkers of cardiac injury and structural changes in cardiac tissue, improved the electrocardiographic profile, decreased the percentage of arrhythmia in vivo and in vitro, reduced calcium waves, prevented changes in BP and blood pressure dynamics. contraction/relaxation of the cardiomyocyte, prevented the increase in I_{Ca,L}, inhibited CaMKII activation, improved redox profile and suppressed apoptotic pathways. The results validate the study design and show a promising potential cardioprotective effect of H β DL.

Keywords: cardiotoxicity. Doxorubicin. D-limonene. Cyclodextrin. CAMKII.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BPM – batimentos por minuto
CaL - canal para Ca^{2+} tipo L
CaMKII – proteína quinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina
CaT - canal para Ca^{2+} tipo T
CAT – catalase
cMLCK - quinase da cadeia leve da miosina
DAD – *delay afterdepolarization*
DDL - despolarização diastólica lenta
DHE - dihidroetidio
DL - D-limoneno
Doxo – doxorrubicina
DP – desvio padrão
EAD – *early afterdepolarization*
ECG – eletrocardiografia
EROs - espécies reativas de oxigênio
FV – fibrilação ventricular
GPx – glutathione peroxidase
H&E - hematoxilina e eosina
HP β CD - hidroxipropil- β -ciclodextrina
H β DL - D-limoneno complexado com hidroxipropil- β -ciclodextrina
i.p. - intraperitoneal
 $I_{\text{Ca,L}}$ - corrente de cálcio pelos canais do tipo L
IK, IKr, IKs, IKur – corrente para potássio com retificação retardada
IK1 – corrente para potássio com retificação de entrada
 $I_{\text{to, fast}}$ – corrente rápida para potássio transiente de saída
 $I_{\text{to, slow}}$ – corrente lenta para potássio transiente de saída
Kdr - *delayed rectifier current*
NAV - nodo atrioventricular
NCX – trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$
NS - nodo sinusal
P, QRS, T – ondas do eletrocardiograma
PA – potencial de ação
PLB - fosfolamban
PRi – intervalo PR do eletrocardiograma
QRS – complexo QRS do eletrocardiograma
RS – retículo sarcoplasmático
RyR2 - receptores de rianodina
SERCA2a - ATPase de Ca^{2+} do RS
Triggered – PA aleatório espontâneo
TV – taquicardia ventricular

Sumário

1 Introdução	11
2 Revisão de Literatura	14
2.2 Acoplamento excitação contração	19
2.3 Eletrocardiografia	21
2.4 Estresse oxidativo	24
2.5 Doxorrubicina e cardiotoxicidade	28
2.5.1 Mecanismos de ação da doxorrubicina	31
2.6 Terpenos	37
2.6.1 Limoneno	39
2.7 Ciclodextrina	42
2.8 Docking Molecular	44
2.9 Hipótese	45
3 Objetivos	46
3.1 Objetivo Geral	46
3.2 Objetivos específicos	46
4 Metodologia	47
4.1 Complexo de inclusão	47
4.2 Animais, tratamentos e delineamento	48
4.3 Análise comportamental para a avaliação de dor	50
4.4 Mensuração das enzimas cardíacas	50
4.5 Peso Corporal	51
4.6 Análises histopatológicas	51
4.7 Medições <i>in vivo</i> de ECG e suscetibilidade a arritmias <i>in vivo</i>	51
4.8 Obtenção de cardiomiócitos	52
4.9 Potencial de ação e indução de arritmia <i>in vitro</i>	53
4.10 Transiente de cálcio	54
4.11 Avaliação da $I_{Ca,L}$	54
4.12 Encurtamento Sarcomérico	55
4.13 Expressão de proteínas pela técnica de Western Blot	56
4.14 Mensuração de EROs citoplasmática e mitocondrial	56
4.15 Mensuração da lipoperoxidação e atividade enzimática da catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase	57
4.16 Docking Molecular	57
4.17 Análise estatística	58
5 Resultados	59

5.1 Efeitos do DL e H β DL sobre os biomarcadores séricos de lesão cardíaca e peso corporal de animais tratados com Doxo	59
5.2 H β DL previne alterações histológicas causadas pela Doxo	60
5.3 Alterações eletrocardiográficas causadas pela Doxo são prevenidas por H β DL	61
5.4 H β DL previne alterações no PA na cardiotoxicidade induzida por Doxo	64
5.5 H β DL impediu o aparecimento de arritmias de estimulação rápida (<i>burst pacing</i>) e reduziu as ondas de Ca ²⁺ induzidas pela Doxo	66
5.6 H β DL impediu o aumento da corrente de Ca ²⁺ do tipo L induzida pela Doxo	69
5.7 H β DL preveniu a redução do encurtamento do sarcômero na cardiotoxicidade induzida pela Doxo	69
5.8 H β DL modula a expressão de pCaMKII e OxiCaMKII alteradas no tratamento com Doxo	70
5.9 H β DL preveniu o aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) devido a cardiotoxicidade induzida pela Doxo	72
5.10 H β DL preveniu o aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) de origem mitocondrial devido a cardiotoxicidade induzida pela Doxo	73
5.11 H β DL restaura a atividade das enzimas antioxidantes endógenas que foram reduzidas no tratamento com Doxo	75
5.12 H β DL suprime vias apoptóticas e peroxidação lipídica induzidas pela Doxo....	76
5.13 Força de ligação entre DL, CaMKII e cMLCK por <i>Docking</i> molecular.....	77
6 Discussão	79
6.1 Limitações	93
7 Conclusão	94
Referências	95

1 Introdução

As terapias antineoplásicas têm proporcionado um aumento considerável na sobrevida de pacientes com câncer; não obstante, esse benefício não veio livre de riscos. Muitas terapias oferecem risco à saúde cardiovascular, em especial a classe dos quimioterápicos, que ainda permanece como um dos principais métodos para o tratamento do câncer. De fato, a doença cardiovascular relacionada ao tratamento do câncer é a segunda principal causa de mortalidade entre os sobreviventes dessa doença (CURIGLIANO *et al.*, 2020).

A Doxorubicina (Doxo), droga da classe das antraciclinas, é um dos medicamentos mais utilizados por poder ser empregada em um grande número de doenças oncológicas, sólidas e hematológicas (CURIGLIANO *et al.*, 2020; HAJJAR *et al.*, 2020). Diversos efeitos colaterais foram verificados com o uso de Doxo, tais como fadiga e atrofia muscular, hemorragias, anemia, problemas neurológicos e muitos outros (CAILLET *et al.*, 2016; SÁNCHEZ-LARA *et al.*, 2013; STRASSER *et al.*, 2013); contudo, a cardiotoxicidade é o principal limitante para o uso da Doxo na prática clínica (PAYNE; NOHRIA, 2017).

A cardiotoxicidade da Doxo é dose dependente - a dose cumulativa constitui-se um fator crucial na clínica, ainda assim, a incidência de cardiotoxicidade pelo uso da Doxo alcança 11% e 1,7%, para cardiotoxicidade aguda e crônica, respectivamente (AVILA *et al.*, 2019; CHATTERJEE *et al.*, 2010; CURIGLIANO *et al.*, 2020; HAJJAR *et al.*, 2020). A cardiotoxicidade pode ser um efeito direto na maioria das terapias antineoplásicas, bem como um efeito secundário a outros distúrbios cardiovasculares dessas terapias (CURIGLIANO *et al.*, 2016; FRADLEY *et al.*, 2021; HAJJAR *et al.*, 2020).

São vários os mecanismos pelos quais a Doxo confere cardiotoxicidade, perpassando por manejo de cálcio (Ca^{2+}) celular, quebras de fita dupla de DNA, apoptose, geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) dentre outros, que levam à uma gama de problemas, da contratilidade à ativação elétrica cardíaca (PRATHUMSAP *et al.*, 2020; SAWICKI *et al.*, 2021). Na clínica, dentre outros efeitos colaterais, essa cardiotoxicidade pode ser representada por alterações no ECG (e.g. taquicardia sinusal, contração ventricular prematura), insuficiência cardíaca congestiva e até mesmo falência cardíaca. Ainda assim, não existe um tratamento específico para a cardiotoxicidade induzida pela Doxo que seja amplamente aceito

ou praticado. Até o momento, a abordagem farmacológica profilática para a cardiotoxicidade conta com medicamentos que de forma genérica atuam como protetoras do miocárdio, como β -bloqueadores, inibidores da enzima conversora da angiotensina, estatinas dentre outros (CURIGLIANO *et al.*, 2020).

Neste contexto de múltipla causalidade para a cardiotoxicidade advinda do uso da Doxo, as substâncias derivadas de produtos naturais parecem ser promissoras, pois são capazes de exercer influência sobre muitas das vias acima citadas, como modulação do sistema redox e apoptose em distintos contextos de doenças cardíacas, como infarto agudo do miocárdio (DURÇO *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2010), lesão de isquemia/reperfusão (BRITTO *et al.*, 2018), hipertrofia cardíaca (JIN *et al.*, 2018) e cardiotoxicidade induzida por antraciclinas (MA *et al.*, 2017).

O limoneno é o monoterpeno mais frequente na natureza (FALK FILIPSSON; BARD; KARLSSON, 1998), e o D-limoneno (DL) - sua principal forma ativa, tem sido estudado por seu potencial efeito antiarrítmico, além de seus efeitos antiproliferativos e antioxidantes (BICAS; PASTORE, 2007; MARINHO *et al.*, 2022; NASCIMENTO *et al.*, 2019). O DL tem baixa solubilidade aquosa e alta volatilidade - o que limita seu uso terapêutico, entretanto, trabalhos anteriores já demonstraram que sua complexação com hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) pode ser uma alternativa para contornar essa situação e melhorar suas propriedades terapêuticas (MARINHO *et al.*, 2022). No entanto, seu desempenho como tratamento na cardiotoxicidade induzida por Doxo permanece desconhecido. Portanto, nosso objetivo foi investigar o efeito cardioprotetor do complexo DL+hidroxipropil- β -ciclodextrina (H β DL) em corações de camundongos *Swiss* submetidos ao tratamento com Doxo.

A possibilidade de desenvolvimento de um tratamento para a prevenção da cardiotoxicidade induzida por Doxo é de especial importância para os pacientes que tiveram câncer na infância, cuja maior causa de morbidade é o uso de antraciclinas (que os torna mais suscetíveis a desenvolver doenças cardíacas que levam a óbito) (COVE-SMITH *et al.*, 2014). Além destes, milhares de pessoas de todas as idades ao redor do mundo também sofrem os efeitos adversos em muitos órgãos alvo, como o coração, trazendo consequências potencialmente devastadoras para a saúde (BRAY *et al.*, 2018).

Portanto, pode-se afirmar que se trata de um problema de saúde global que pode afetar substancialmente o bem-estar do indivíduo, mental, físico e social. Os

achados deste trabalho podem sinalizar um possível tratamento preventivo para os efeitos nocivos causados no tecido cardíaco de pacientes que realizam quimioterapia com Doxo, possibilitando melhoria no prognóstico destes.

2 Revisão de Literatura

2.1 Excitabilidade celular

O batimento cardíaco tem sua origem na atividade elétrica espontânea das células marca-passo. A atividade elétrica gerada em tais células é transmitida de maneira ordenada espaço-temporalmente, tendo as células ventriculares como alvo final.

Etimologicamente, denomina-se cardiomiócito as células musculares que constituem o coração. Esse termo, na maioria das vezes, é utilizado de forma indiscriminada para todas as células do coração; todavia, existem diferenças morfofuncionais entre as células contráteis e as que geram o estímulo elétrico. As células que geram o estímulo elétrico estão localizadas em regiões específicas, especialmente no nodo sinoatrial (NSA) e nodo atrioventricular (NAV). Células presentes no feixe de His e fibras de Purkinje também podem gerar uma autoexcitabilidade; todavia, num contexto fisiológico, as células do NSA, ditas células marca-passo, são as responsáveis pelo estímulo elétrico (KEEPERS; LIU; QIAN, 2020; LIANG *et al.*, 2021).

As células cardíacas possuem propriedades específicas de excitabilidade – são capazes de serem excitadas em resposta a um determinado estímulo; inotropismo – são capazes de se contrair a partir de um estímulo; cronotropismo – são capazes de gerar sua própria frequência; dromotropismo – são capazes de propagar o estímulo (gerado no NSA num coração saudável) para todas as células cardíacas; e lusitropismo – são capazes de relaxar mediante um estímulo (diminuição do Ca^{2+} citosólico) (RIPA *et al.*, 2023; TSUBOI *et al.*, 2000).

Sob a perspectiva celular, o ciclo elétrico cardíaco é iniciado e sustentado pelo fluxo de íons através dos canais iônicos, trocadores e ATPases (bombas) presentes na membrana das células excitáveis do coração. A distribuição heterogênea desses canais iônicos nas células determina o formato do potencial de ação (PA) e, conseqüentemente, do eletrocardiograma (ECG). Portanto, a morfologia do PA desempenha um papel fundamental no funcionamento adequado do coração (RIPA *et al.*, 2023).

O PA cardíaco apresenta variações em diferentes regiões do coração, sendo possível identificar dois principais tipos: o PA de resposta lenta, que ocorre nos nódulos sinoatrial (NSA) e atrioventricular (NAV), e o de resposta rápida, que ocorre

nos cardiomiócitos atriais e ventriculares e sistema de condução (sistema His-Purkinje) (PORTER *et al.*, 2018; RIPA *et al.*, 2023).

O PA de resposta lenta divide-se nas fases 4, 0 e 3. A fase 4, nas células nodais, é também conhecida como despolarização diastólica lenta (DDL), envolve a participação de canais controlados por nucleotídeos cíclicos ativados por hiperpolarização (HCN), popularmente chamados de "Funny", além do canal para Ca^{2+} tipo T e o trocador sódio-cálcio (NCX - $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$). A corrente através dos canais HCN, geralmente designada como I_f "Funny", é um canal catiônico responsável pelo aumento da permeabilidade ao íon Na^+ em valores em torno de -50 mV e, em valores mais positivos (0mV), pela saída de K^+ (DIFRANCESCO DARIO, 2010).

No nó sinusal, a isoforma principal expressa é a HCN4, embora também tenham sido relatados baixos níveis de HCN1 e HCN2. Outro canal de extrema importância para a geração da DDL é o canal para Ca^{2+} tipo T. Como membro da subfamília Cav3x de canais de cálcio dependentes de voltagem, a função do canal tipo T é crucial para a DDL, permitindo a entrada de Ca^{2+} , e aumentando assim o influxo de correntes despolarizantes. Outra corrente importante para gerar a DDL é a corrente do trocador sódio-cálcio (NCX - $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$), que é uma proteína de membrana antiportadora responsável pela remoção de íons Ca^{2+} das células. Função essa desempenhada ao aproveitar a energia armazenada no gradiente eletroquímico de sódio (Na^+), permitindo que o Na^+ flua ao longo do seu gradiente através da membrana plasmática em troca do transporte contrário de íons cálcio (Ca^{2+}). Nesse processo, um único íon de cálcio é exportado em troca da importação de três íons de sódio (DIFRANCESCO DARIO, 2010).

Tais eventos fazem com que a membrana alcance voltagens mais positivas, oportunizando a abertura do canal para Ca^{2+} tipo L - Ca_L (~-40 mV) e com isso, o Ca^{2+} que entra na célula gera a despolarização, ou fase 0. A inclinação da fase 0 acompanha a característica lenta da abertura do canal para Ca_L , dando a configuração característica do PA lento visto na Figura 01. Não apenas a cinética de abertura, mas também de inativação desse canal é lenta, assim uma repolarização, ou fase 3, com essa mesma característica também é evidenciada. Na fase 3, há o envolvimento em especial dos canais Kdr (*delayed rectifier current*) lento (K_s - *slow*) e rápido (K_r - *rapid*) (DIFRANCESCO DARIO, 2010).

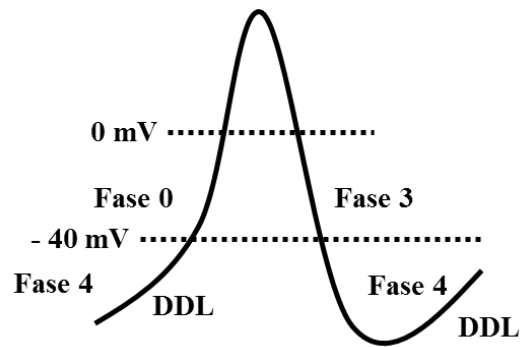


Figura 01. Potencial de ação lento (célula marcapasso cardíaca). Fase 0 – despolarização, corrente de cálcio pelos canais do tipo L ($I_{Ca,L}$); Fase 3 – repolarização, corrente de potássio retificador retardado rápido (I_{Kr}) e lento (I_{Ks}); Fase 4 - despolarização diastólica lenta (DDL), canais controlados por nucleotídeos cíclicos ativados por hiperpolarização (HCN), canal para Ca^{2+} tipo T, trocador sódio-cálcio (NCX - Na^+/Ca^{2+}). Fonte: Souza, 2019.

O Potencial de Ação (PA) rápido nas células cardíacas pode ser categorizado em cinco fases. Na fase 0, ocorre a abertura dos canais de sódio dependentes de voltagem (Nav 1.5), desencadeando o processo de despolarização e diminuição da corrente de K^+ retificadora de entrada (I_{K1}). A fase 1 está associada à rápida inativação da corrente de sódio (I_{Na}) e à abertura do canal de potássio denominado transiente de efluxo (Kto1 - Kv4.2 e Kv4.3), marcando o início da repolarização (PORTER *et al.*, 2018). A fase 1, adicionalmente, incorpora uma corrente repolarizante por meio de um canal específico para cloreto (I_{to2}). Dada a sua proximidade ao potencial de equilíbrio em torno de -50 mV, o íon Cl^- apresenta uma propensão ao influxo na célula, seguindo o gradiente eletroquímico ao longo de praticamente toda a fase de repolarização (DUAN, 2013; PINNELL; TURNER; HOWELL, 2007).

A fase 2 representa o platô, caracterizado pela abertura dos canais CaL (Cav 1.2) e pela redução da condutância ao potássio. Ao final da fase 2, ocorre a abertura completa dos canais de potássio retificadores retardados (iniciada na fase 0), conhecidos como *delayed rectifier* (Kdr – rápida, Kr – Kv11.1, e lenta Ks – Kv7.1), que possuem uma retificação lenta, conduzindo à repolarização e à fase 3 (final da repolarização), possuindo nas células atriais um subtipo ultra rápido (I_{Kur} – Kv1.5) (CHOE, 2002). A fase 4 é marcada pela corrente de potássio retificadora de entrada (I_{K1} – Kir2.1, cujos canais reabrem já na fase 3), responsável por atuar na fase

tardia da repolarização e manter o potencial de repouso (PINNELL; TURNER; HOWELL, 2007). O PA rápido pode ser visto na Figura 02.

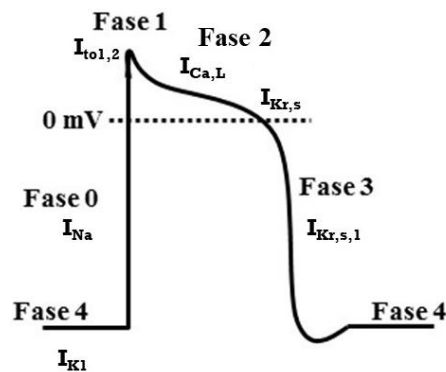


Figura 02. Potencial de ação rápido cardíaco e suas principais correntes iônicas. Fase 0 – despolarização corrente de sódio (I_{Na}); fase 1- repolarização rápida, corrente transiente de efluxo ($I_{to1,2}$); fase 2 – platô, corrente de cálcio pelos canais do tipo L ($I_{Ca,L}$); fase 3 – repolarização, corrente de potássio retificador retardado rápido (I_{Kr}) e lento (I_{Ks}); fase 4 – repouso, corrente retificadora de entrada (I_{K1}). Fonte: Souza, 2019.

O fluxo sequencial de íons, coordenado pela especificidade dos canais iônicos, temporalmente define as fases do PA cardíaco. Quando em estado aberto, esses canais iônicos permitem o fluxo passivo de íons Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^- , seguindo o gradiente eletroquímico, controlando assim as propriedades elétricas das células. Classificados de acordo com os mecanismos de abertura, os canais iônicos pertencem a diferentes famílias, sendo uma delas os canais dependentes de voltagem. Esta família desempenha um papel predominante no controle das propriedades do PA nas células excitáveis do coração. Portanto, a integridade da estrutura do complexo macromolecular que constitui os canais iônicos é essencial para a manutenção do ciclo elétrico cardíaco (AHMED *et al.*, 2017; AMIN; TAN; WILDE, 2010).

Do ponto de vista estrutural, os principais canais iônicos sensíveis à voltagem apresentam uma organização semelhante. A subunidade principal, designada subunidade α , é composta por quatro domínios, cada um contendo seis segmentos transmembrana. A região entre os segmentos 5-6 de cada domínio contribui para a formação do poro, enquanto os segmentos 1-4 constituem o módulo de voltagem. O segmento S4, com 4 a 7 resíduos de aminoácidos carregados positivamente

(geralmente arginina), seguido por dois resíduos hidrofóbicos, é considerado o sensor de voltagem. Em muitos canais iônicos, a passagem pelo poro é regulada por um "gate" que pode estar aberto ou fechado em resposta a sinais químicos, elétricos, temperatura ou força mecânica. Além da subunidade principal, os canais apresentam subunidades auxiliares, tais como β , γ e δ (BEZANILLA, 2005; CATTERALL, 2014).

Entre os canais cardíacos, destaca-se a estrutura complementar do canal de sódio, localizada entre o segmento S6 do domínio 3 e o segmento S1 do domínio 4. Essa estrutura é reconhecida como uma das principais associadas à inativação do canal de sódio chamada de partícula de inativação ou motivo IFM (isoleucina, fenilalanina e metionina). Mutações e modulações nessa estrutura são conhecidas por causar desordens do ritmo cardíaco (AHMED *et al.*, 2017; CATTERALL, 2014; HORVÁTH *et al.*, 2020).

Assim, no coração a onda elétrica origina-se no NSA, é propagado para os átrios direito e esquerdo, respectivamente, e alcança o nodo atrioventricular (NAV). Do NAV, há seguimento da atividade elétrica para o feixe de His e fibras de Purkinje, sendo então propagada para os ventrículos, inicialmente na face endocárdica, até atingir toda a musculatura ventricular (KIANI *et al.*, 2013). O sistema excito-condutor do coração pode ser visto na Figura 03.

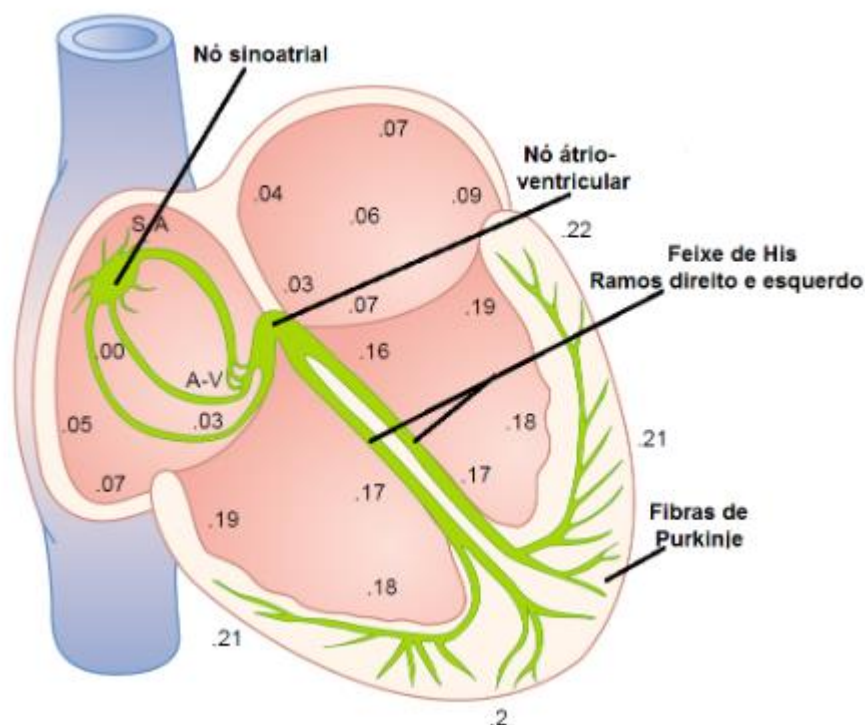


Figura 03. Sistema excito-condutor do coração. Transmissão do impulso cardíaco iniciado no nodo sinoatrial, e o tempo de aparecimento nas diferentes partes do órgão (exibido em segundos). Fonte: Guyton e Hall Tratado de Fisiologia Médica - 13ª Edição.

2.2 Acoplamento excitação contração

Estabelecida a atividade elétrica cardíaca como um PA este conduz à parte mecânica (contração/relaxamento), cujo conjunto é denominado acoplamento excitação-contração (AEC), onde o íon cálcio é o protagonista.

Como visto, a despolarização ocasionada pelo PA leva à abertura dos canais para Ca^{2+} , localizados em maior quantidade nas regiões dos túbulos T. A quantidade de Ca^{2+} que entra pelo canal para cálcio dependente de voltagem tipo L, subunidade alfa 1C (Cav1.2) funciona como um gatilho para que o Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS), localizado próximo aos túbulos T, seja liberado através dos receptores de rianodina (RyR) – o Ca^{2+} se liga nesses receptores, cuja isoforma mais expressa no coração é RyR2, sendo essa a maior fonte de aumento da concentração intracelular de cálcio ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) (BERS, 2002).

Ao aumento transitório de Ca^{2+} citoplasmático, dá-se o nome de transiente intracelular global de Ca^{2+} (BERS, 2002; EISNER *et al.*, 2017), responsável pela contração cardíaca regular, como será abordado a seguir. Ele difere de liberações pontuais e discretas de Ca^{2+} pelo RyR2, denominadas *sparks* de Ca^{2+} (CHENG; LEDERER, 2008; EISNER *et al.*, 2017; HOANG-TRONG; ULLAH; JAFRI, 2015).

O aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ favorece sua ligação a troponina C, o complexo Ca^{2+} -troponina leva à uma alteração conformacional em que a troponina I expõe os sítios de ligação na actina, oportunizando sua ligação à miosina. Durante a junção actina-miosina, há hidrólise do ATP (trifosfato de adenosina), que se encontra na cabeça leve da miosina, em ADP (difosfato de adenosina) e a energia dessa reação leva à uma mudança conformacional que oportuniza o deslizamento dos filamentos de actina e miosina uns sobre os outros, o que resulta no encurtamento do sarcômero (BERS, 2002; EISNER *et al.*, 2017).

Para que a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ diminua, resultando assim no relaxamento celular, mecanismos para a remoção do Ca^{2+} do citoplasma são ativados, dentre os quais a ativação da Ca^{2+} -ATPase do sarcolema (*plasma-membrane* Ca^{2+} -ATPases -

PMCA), o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), uniporte de Ca^{2+} mitocondrial e ATPase de Ca^{2+} do RS (SERCA2a); todavia, a SERCA2a é a que tem maior relevância na diminuição da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (responsável por mais de 90% da recaptação em ratos e 70% em humanos) (BASSANI; BASSANI; BERS 1994; BERS, 2002; EISNER *et al.*, 2017).

A SERCA2a possui um regulador natural, a fosfolambam (PLB). Essa proteína, quando desativada, inibe a recaptação de Ca^{2+} pela SERCA2a. Quando a PLB é ativada - o que pode ser feito por proteínas quinases como a proteína kinase A (PKA), proteína kinase C (PKC) ou proteína quinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII) - deixa de inibir a SERCA2a, o que acelera a recaptação de Ca^{2+} por esta para o RS (BASSANI; YUAN; BERS, 1995; EISNER *et al.*, 2017). Com a diminuição da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, a troponina C e o Ca^{2+} se desligam, os sítios de ligação da actina são inativados e há substituição do ADP por ATP na cabeça da miosina, até que outro evento se inicie (BERS, 2002). A dinâmica do processo de excitação contração pode ser vista na Figura 4.

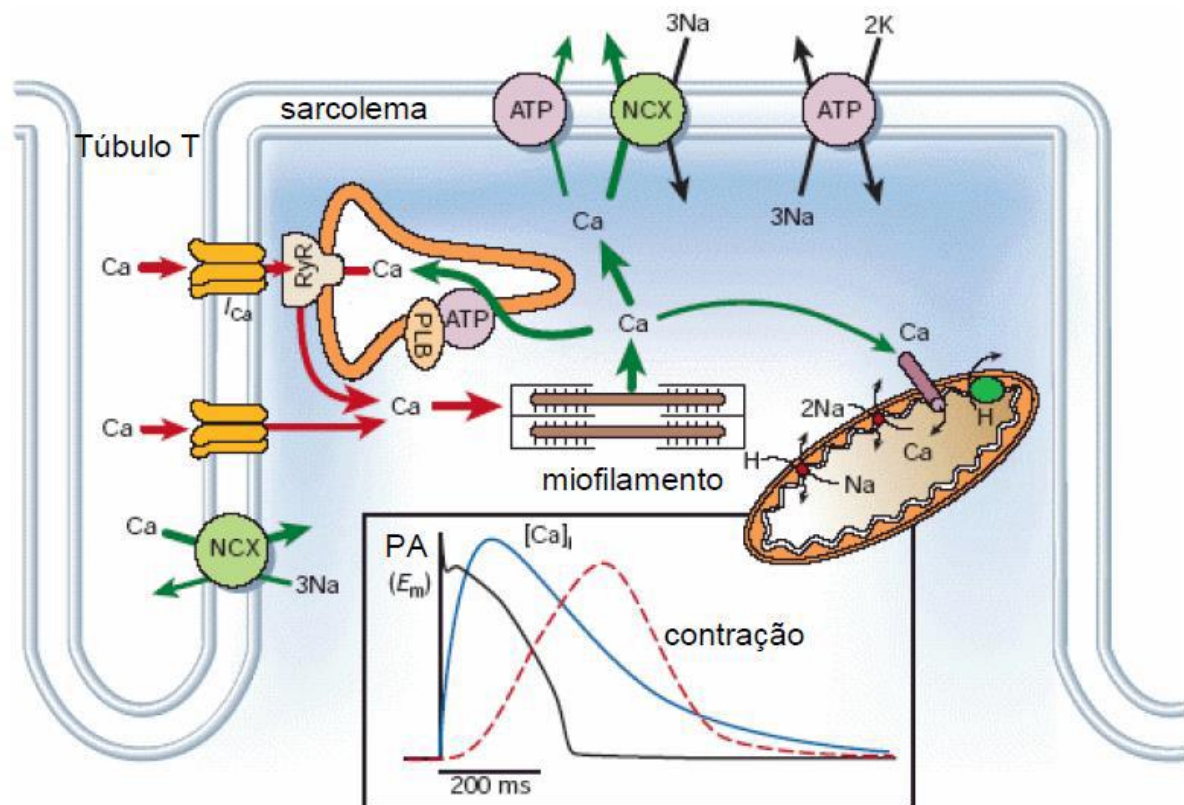


Figura 04. Sinalização intracelular de cálcio no cardiomiócito. NCX: trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; RyR: receptor da rianodina; PLB: fosfolambam; E_m : potencial da membrana. Fonte: adaptado de Bers, 2002.

2.3 Atividade elétrica do coração e Arritmias

Os primeiros experimentos pra entender como o sistema elétrico funciona no organismo humano começaram em 1660. Cientistas como Luigi Galvani, Carlo Matteucci, Augustus Waller dentre outros deixaram valiosas contribuições para a evolução dessa área (ALGHATRIF; LINDSAY, 2012; BRESADOLA, 1998). Todavia, o maior avanço foi alcançado por Willem Einthoven ao criar um aparelho específico pra medir a atividade elétrica do músculo cardíaco (ALGHATRIF; LINDSAY, 2012).

De forma genérica, pode-se dizer que o coração é ativado por estímulos elétricos, que vão num sentido ordenado da base para o ápice do coração; nas células ventriculares, a despolarização acontece do endocárdio em direção ao epicárdio e, devido a características específicas das células do epicárdio, como por exemplo apresentarem densidade maior para correntes de K^+ , as mesmas apresentam um PA mais curto e iniciam a repolarização antes das células endocárdicas, i.e. a repolarização ocorre no sentido do epicárdio para o endocárdio. Tal informação proporciona o entendimento que a despolarização e a repolarização são mensuradas através de uma projeção gráfica vetorial que possui direção, sentido e intensidade, ditas deflexões ou ondas, que tomando por referência uma linha de base, podem ser positivas – quando acima da linha de base, ou negativas – quando abaixo dessa linha. Essas deflexões foram nomeadas como ondas P, Q, R, S e T (ALGHATRIF; LINDSAY, 2012).

Considerando que a despolarização dos cardiomiócitos não ocorre de forma estocástica, o direcionamento da despolarização é dado da seguinte forma: inicialmente o estímulo é deflagrado pelo NSA, o marca-passo cardíaco, em direção a células basais ventriculares. A ativação cardíaca possui diversos vetores, nesse texto serão abordados os vetores resultantes de cada área.

O estímulo inicialmente deflagrado pelas células do NSA é imediatamente conduzido, pelas vias internodais, para os átrios direito e esquerdo, respectivamente. Então temos que o vetor resultante do átrio direito se dirige para baixo, para esquerda e para frente, e o vetor resultante do átrio esquerdo se orienta para baixo, para esquerda e para trás. Durante a despolarização dos átrios é possível obter um vetor resultante atrial que se orienta para baixo, para esquerda e para frente ou para trás. A projeção desse vetor resultante da ativação dos átrios em uma determinada derivação do eletrocardiograma dá-se o nome de onda P (PASTORE *et al.*, 2016).

A despolarização alcança então o NAV, que devido sua estrutura pobre em junções gap e natureza conjuntiva, retarda o impulso. Isso oportuniza que os átrios se contraíam de forma tal que haja um esvaziamento adequado dos mesmos. O impulso segue então do NAV para o feixe de His e fibras de Purkinje (ALGHATRIF; LINDSAY, 2012; PASTORE *et al.*, 2016).

O impulso elétrico, alcançando então os feixes do sistema His-Purkinje, propaga quase que instantaneamente o potencial para os ventrículos, a partir do septo interventricular, em direção ao ápice e base ventriculares. Como a massa dos ventrículos é robusta, os vetores são divididos em áreas. O septo ventricular é a primeira área, sendo seu vetor resultante direcionado para baixo ou para cima, para frente e para direita. Então, as áreas anteriores e apicais do septo ventricular geram um vetor para baixo, para frente e para esquerda. A terceira região é o vetor ventricular direito e esquerdo, que se dirige para baixo, para trás e para esquerda. E por último, tem-se o vetor da região posterobasal, que se orienta para cima, para trás e para o plano sagital. Aos vetores que resultam da despolarização dos ventrículos, dá-se o nome de complexo QRS (SUBRAMANIAN, 2017). O potencial elétrico de repolarização ventricular acontece em seguida, sendo este denominado onda T, onde o vetor resultante se dirige para baixo, para trás e para esquerda (PASTORE *et al.*, 2016).

Há ainda outras áreas no ECG, identificadas como intervalos e segmentos. O intervalo PR refere-se ao início da ativação elétrica no NSA até o princípio da ativação do feixe de His e fibras de Purkinje, sendo localizado no ECG do início da onda P até o início do complexo QRS. O segmento PR representa o tempo decorrido onde a onda despolarizante trafega pelo NAV e pelo sistema His-Purkinje em direção ao septo ventricular, e pode ser identificado no ECG do final da onda P até o começo da onda Q (PASTORE *et al.*, 2016).

O intervalo identificado no ECG como QT refere-se ao tempo decorrido entre o início da despolarização ventricular até o fim da repolarização desta, sendo portanto medido do início do complexo QRS até o final da onda T. Assim, pode-se entender que a duração deste intervalo é afetada pela frequência cardíaca. Para contornar esse problema, o intervalo é corrigido pela frequência cardíaca e uma das formas de fazê-lo é através da fórmula de Bazett: $QT_c = QT / \sqrt{RR}$ (POSTEMA; WILDE, 2014). O segmento ST refere-se ao tempo entre o final da despolarização ventricular e o começo da repolarização ventricular, sendo localizado no ECG do final do

complexo QRS até o início da onda T (PASTORE *et al.*, 2016). A representação do ECG com suas ondas, segmentos e intervalos pode ser vista na Figura 05.

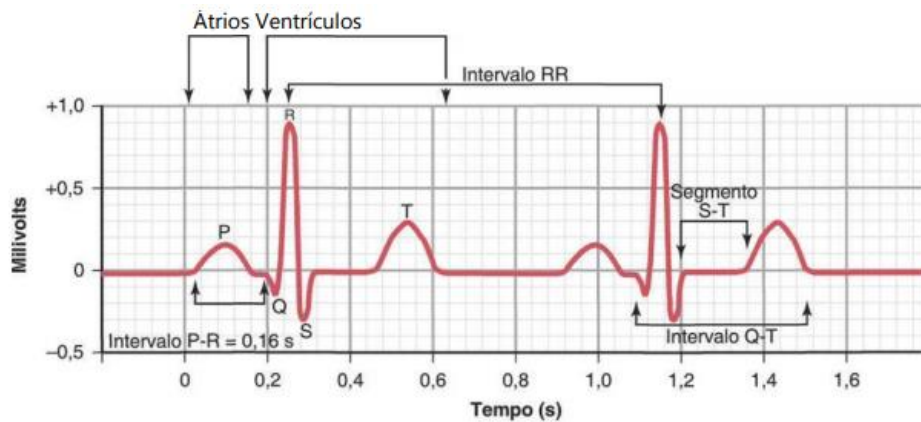


Figura 05. Eletrocardiograma normal e seus intervalos. Fonte: Guyton e Hall Tratado de Fisiologia Médica - 13ª Edição.

O intervalo QT é bem utilizado para demonstrar a segurança no uso de alguma droga, sendo, portanto, um dos critérios utilizados para monitorar a cardiotoxicidade induzida pela Doxo, estando neste contexto o mesmo aumentado. Demais alterações no ECG também são observadas na cardiotoxicidade induzida pela Doxo, como taquicardia sinusal, batimento ventricular e atrial prematuros, além de arritmias (CHATTERJEE *et al.*, 2010; CURIGLIANO *et al.*, 2020).

Avaliando-se o PA do cardiomiócito, como discorrido na seção 2.1, pode-se entender que mudanças nesse PA podem predispor arritmias, sejam tais mudanças nos mecanismos que corroboram para a concretização do PA da célula cardíaca, como por exemplo os canais iônicos envolvidos no PA, ou nas características do próprio PA, como velocidade de despolarização ou período em que a célula recupera a sua excitabilidade. Ambas as situações acarretarão em distúrbios de condução elétrica (TSE, 2016).

Distúrbios que afetam a condução elétrica a nível celular podem ser classificados como EADs (*early afterdepolarizations*) ou pós-despolarizações precoces e as DADs (*delay afterdepolarizations*) ou pós-despolarizações tardias.

As EADs originam-se antes que a célula esteja completamente repolarizada, portanto, acontecem entre as fases 2 e 3 do PA (SONG *et al.*, 2015; TSE, 2016). Situações que prolongam o PA (i.e. aumento de $I_{Ca, L}$ ou redução das I_{K+}) permitem que os canais de cálcio se recuperem da inativação e se abram novamente, levando à um maior influxo de Ca^{2+} . Da mesma forma, a fosforilação direta desses canais de

cálcio pela CaMKII também diminui seu tempo de inativação, culminando em aumento da $[Ca^{2+}]_i$. Ambas as situações aumentam a probabilidade das EADs (LANDSTROM; DOBREV; WEHRENS, 2017; SONG *et al.*, 2015).

As DADs originam-se depois da completa repolarização da célula (SONG *et al.*, 2015; TSE, 2016), portanto, acontecem geralmente durante a diástole. O Ca^{2+} também se faz necessário nessa situação, sendo a amplitude da DAD definida por um balanço entre a condutância em repouso da I_{K1} e a amplitude da corrente do trocador sódio cálcio (I_{NCX}). A amplitude da DAD é de especial importância porque atingindo o limiar de excitação, deflagra-se uma nova corrente despolarizante, favorecendo o surgimento de PAs espontâneos (*triggered*) (LANDSTROM; DOBREV; WEHRENS, 2017; SONG *et al.*, 2015).

Logo, circunstâncias que façam com que haja o aumento citosólico do Ca^{2+} , como liberações inadvertidas e instáveis de Ca^{2+} pelo RyR2, podem gerar ondas de Ca^{2+} que culminarão em arritmias (LANDSTROM; DOBREV; WEHRENS, 2017).

Outro mecanismo associado ao aumento do Ca^{2+} intracelular é a ativação da CaMKII, que embora seja ativada pelo Ca^{2+} num cenário fisiológico, quando há aumento da $[Ca^{2+}]_i$ pode também ser ativada por espécies reativas de oxigênio - EROs (MONNERAT *et al.*, 2016). Na verdade, quando ativada por EROs, a CaMKII permanece em seu estado ativo. Tal estado constante de ativação da CaMKII é especialmente deletério para o coração, pois como já descrito, a CaMKII ativada aumenta a $I_{Ca, L}$, que em última instância, aumentará a probabilidade de arritmias (LUCZAK; ANDERSON, 2014; MONNERAT *et al.*, 2016; SINGH *et al.*, 2012, p. 8).

As arritmias decorrentes do tratamento com Doxo podem ser vistas logo depois da sua primeira administração ou até mesmo anos após o tratamento (HAZARI *et al.*, 2009). De fato, distintos mecanismos de ação da cardiotoxicidade induzida pela Doxo levam ao aumento intracelular de Ca^{2+} e geração de EROs, como abordado na seção 2.7.1, podendo induzir o aparecimento de arritmias.

2.4 Estresse oxidativo

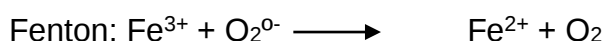
Espécies reativas (ER) podem ser originadas do oxigênio (ERO), nitrogênio (ERN) ou enxofre (SIES; JONES, 2020) e, salvo indicação no texto, esta seção se aterá àquelas geradas pelo oxigênio (EROs). Englobam distintas moléculas como o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$), o

peroxinitrito (ONOO^-), o óxido nítrico (NO°) dentre outros. Quando as espécies reativas possuem elétrons desemparelhados, são ditas como radicais livres (LI; JIA; TRUSH, 2016). Tal característica do radical livre é o que oportuniza que ele esteja pronto para interagir com outras estruturas, o que o configura como uma molécula instável.

Espécies reativas são essenciais para vários processos fisiológicos do organismo humano - como na fecundação do óvulo, no sistema de defesa, na sinalização celular e em muitos outros processos (LUSHCHAK, 2014), e para que sua atuação permaneça benéfica, moléculas antioxidantes garantem a manutenção dos níveis de espécie reativa, permitindo a quantidade necessária para o desempenho das funções biológicas. O problema reside nas situações em que há uma quantidade maior que o necessário dessas espécies, seja pelo aumento direto nessas ou pela redução de moléculas antioxidantes. A esse desequilíbrio entre fatores pró-oxidantes e antioxidantes, dá-se o nome de estresse oxidativo (HALLIWELL, 2006).

Os fatores antioxidantes pertencem a um sistema de defesa antioxidante, que pode ser dividido em parte endógena e exógena (nutrientes que possuem propriedades antioxidantes). Dentre os antioxidantes exógenos podemos citar algumas vitaminas como o ácido ascórbico e vitamina E, além de carotenoides, glutathione dentre outros (BLANCO; BLANCO, 2017). O sistema de defesa endógeno consiste basicamente, mas não exclusivamente, em enzimas com ação específica sobre cada espécie reativa, assim, faz-se necessário inicialmente abordar tais.

A maior parte das EROs são geradas na cadeia de transporte de elétrons (SIES; JONES, 2020). Além da mitocôndria, EROs também podem ser geradas no citoplasma e sarcolema. Para catalisar a reação que leva à formação das espécies reativas, há a participação de íons metálicos como o ferro, sendo as transformações detalhadas pelas reações de Fenton e Haber-Weiss, como pode ser visto abaixo (BLANCO; BLANCO, 2017; LUSHCHAK, 2014).



O H_2O_2 é normalmente gerado pelas células fagocíticas, como parte da linha de defesa contra patógenos, ou como produto da degradação de ácidos graxos. Não

é a ERO que mais pode causar dano, mas além de poder cruzar a membrana celular facilmente, ela participa em reações que geram novas EROs, por vezes com maior poder oxidativo, como o radical $\text{OH}^\bullet$ (BLANCO; BLANCO, 2017).

A ERO mais comum é o ânion superóxido. Ela é formada em maior parte pela mitocôndria, na cadeia de transporte de elétrons, mais especificamente em seus complexos I (NADH: ubiquinona oxidoreductase) e III (ubiquinol: citocromo c oxidoreductase) (BLANCO; BLANCO, 2017; HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). Assim como o peróxido de hidrogênio, o dano maior do superóxido está relacionado a sua capacidade de formar, através das reações de Fenton e de Haber-Weiss, o radical hidroxila (BLANCO; BLANCO, 2017).

O radical $\text{OH}^\bullet$, embora tenha o seu poder de ação bem limitado em termo espacial, é a ERO que mais pode causar dano, devido à sua natureza altamente reativa. Além de ser originada em reações cujo superóxido e peróxido de hidrogênio participam, ela também pode ser formada na reação de Fenton, na presença de ferro (BLANCO; BLANCO, 2017; LI; JIA; TRUSH, 2016).

Sendo as espécies reativas necessárias, num cenário fisiológico o organismo consegue manter a razão entre a geração de EROs e de componentes do sistema antioxidante. Como dito anteriormente, componentes do sistema de defesa endógeno têm ação específica para certas EROs. A enzima superóxido dismutase (SOD), com vasta presença em todos os tecidos, é responsável por remover o superóxido, convertendo dois ânions superóxido em uma molécula de H_2O_2 e oxigênio. O H_2O_2 , por sua vez, também é uma ERO, sendo a sua remoção realizada pela catalase (CAT), hemoproteína presente na maioria das células. A catalase decompõe o H_2O_2 em água e oxigênio (BLANCO; BLANCO, 2017; LI; JIA; TRUSH, 2016).

O H_2O_2 também pode ser degradado pela glutathione peroxidase (GPx), localizada no citosol e mitocôndria das células. Quando a GPx age no H_2O_2 , ela o faz usando a glutathione (GSH) como um doador de hidrogênio, nessa reação cada glutathione doa um elétron de seu grupo sulfidril, e os radicais resultantes se unem para formar a glutathione oxidada (GSSG), que é reduzida de volta a GSH pela glutathione redutase (BLANCO; BLANCO, 2017; LI; JIA; TRUSH, 2016).

As EROs acima citadas, como também várias outras que não foram nessa peça contempladas, são capazes de lesionar lipídeos, proteínas, DNA dentre outros, culminando em morte celular. Essa faceta nociva da espécie reativa é exibida nas

situações em que o sistema de defesa antioxidante não consegue atuar, seja por não conseguir eliminar a espécie reativa, por não conseguir impedir a formação delas ou por não conseguir reparar os danos por elas causados (BLANCO; BLANCO, 2017; LI; JIA; TRUSH, 2016). Um indicador bem utilizado para avaliar o *status* desse (des)equilíbrio é a peroxidação lipídica, uma vez que os ácidos graxos não raro são alvos dos radicais livres (PANTH; PAUDEL; PARAJULI, 2016).

No coração, a necessidade de equilíbrio entre EROs e sistema de defesa antioxidante também é fundamental. Em condições fisiológicas as EROs contribuem, por exemplo, para a maturação dos cardiomiócitos, o manejo do Ca^{2+} , o acoplamento excitação-contração dentre outros, já em condições patológicas, estão envolvidas no infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca e aterosclerose (PEOPLES *et al.*, 2019; TERYTYEV *et al.*, 2008), ou seja, o estresse oxidativo não apenas lesiona estruturas celulares como também altera vias moleculares, contribuindo na gênese das doenças cardiovasculares.

A maior fonte de EROs no coração é a mitocôndria, através da cadeia de transporte de elétrons, e considerando que os cardiomiócitos consomem mais oxigênio, eles também possuem mais mitocôndrias que outras células. Dentre as principais fontes de EROs nas doenças cardíacas pode-se citar NAD(P)H oxidase (NOX) – em especial a NOX2 e NOX4 – abundantes nos cardiomiócitos, citocromo P450 e respiração mitocondrial (PANTH; PAUDEL; PARAJULI, 2016; PEOPLES *et al.*, 2019).

Na mitocôndria, o dano à sua função pode também ser decorrente de diminuição na GPx ou MnSOD (SOD específica da mitocôndria) (PEOPLES *et al.*, 2019), além da alteração do metabolismo de Ca^{2+} . Este último, quando sobrecarregado na mitocôndria, aumenta a geração de EROs e leva à abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, culminando em apoptose (PANTH; PAUDEL; PARAJULI, 2016).

A fibrose está presente em várias doenças cardíacas - alterações nos mecanismos bioquímicos e na contratilidade do cardiomiócito levam a alterações estruturais e funcionais que resultam na fibrose (MORIS *et al.*, 2017). De fato, alguns estudos demonstraram que as EROs num contexto de estresse oxidativo podem oxidar proteínas miofibrilares (HEUSCH *et al.*, 2010; SCHENKEL *et al.*, 2010).

Na insuficiência cardíaca, o estresse oxidativo, em especial o aumento de superóxido dependente da NADPH oxidase, acompanhado ou não de diminuição de

enzimas antioxidantes, também foi relatado. Essas EROs afetam a dinâmica de liberação do Ca^{2+} pelo RyR2, oxidando RyR2 e levando à liberação inadvertida de Ca^{2+} , impactando assim diretamente no sistema de acoplamento excitação-contracção cardíaco (TERENTYEV *et al.*, 2008). Essa dinâmica explica a presença da arritmia e disfunção contrátil na composição do fenótipo da insuficiência cardíaca (PEOPLES *et al.*, 2019).

A forte conexão entre estresse oxidativo (global), EROs geradas na mitocôndria e doenças cardíacas aponta uma área para terapêutica nessa temática – por limitar a produção de EROs ou aumentar a atuação do sistema de defesa antioxidante (PEOPLES *et al.*, 2019).

2.5 Doxorrubicina e cardiotoxicidade

A Doxo é um antibiótico da classe das antraciclinas, isolado da cultura da bactéria *Streptomyces spp.*. Quimicamente é composto de um núcleo naftacenequinona unido através de ligação glicosídica ao açúcar amina, a daunosamina (Figura 06). Na estrutura da antraciclina, há uma porção lipofílica e rica em hidroxila saturada, vizinha ao açúcar amina que é hidrofílico. A parte lipofílica da Doxo mostra natureza ácida e o amino açúcar na parte hidrofílica, natureza básica. Tais características bioquímicas proporcionam que a Doxo se ligue especialmente a membranas. A excreção da Doxo ocorre na maior parte através da bile (>40%), sendo aproximadamente 4-5% atribuídos à excreção urinária (RAWAT *et al.*, 2021).

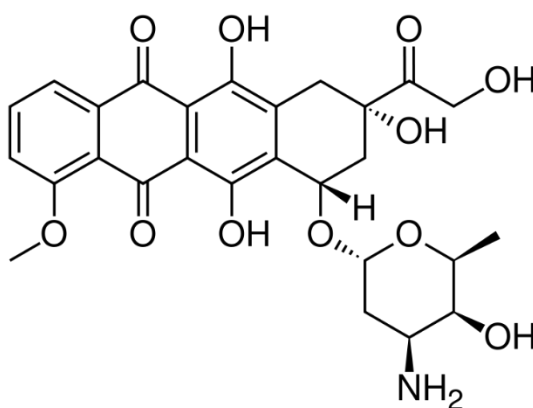


Figura 06. Estrutura química da doxorrubicina. Fonte: adaptado de Frederick *et al.*, 1990.

A atividade antitumoral da Doxo foi reportada na década de 60 (ADÃO *et al.*, 2013; BACHUR, 2002; BOOSER; HORTOBAGYI, 1994). O primeiro representante dessa classe, a daunorrubicina, foi identificado nos anos 50, sendo mais tarde constatado que seu análogo, a Doxo, possuía maior poder antitumoral (ADÃO *et al.*, 2013; BOOSER; HORTOBAGYI, 1994). Tão logo quanto descoberto seu potencial antineoplásico, foi também observado uma das maiores complicações relacionadas ao seu uso, a toxicidade cardíaca (VOLKOVA; RUSSELL, 2011).

A cardiotoxicidade decorrente do tratamento anticâncer não se restringe às antraciclinas, podendo ser também estendida a outros tipos de tratamentos como o HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*), drogas com alvos moleculares como trastuzumabe ou pertuzumabe, VEGF (*vascular endothelial growth factor*), dentre outros (CURIGLIANO *et al.*, 2020). Assim, as drogas antineoplásicas costumam ser classificadas em tipo 1 e tipo 2, sendo as do tipo 1 aquelas que causam lesões irreversíveis a nível celular, ou seja, os mecanismos que lesionam os cardiomiócitos o fazem de maneira direta e permanente, ademais, tais drogas representam danos progressivos conforme dose acumulada. As drogas do tipo 2 referem-se àquelas cujo mecanismo, apesar de tornar os cardiomiócitos disfuncionais, não representa uma lesão irreversível, havendo portanto chance de recuperação (ADÃO *et al.*, 2013; KOUTSOUKIS *et al.*, 2018).

As antraciclinas estão entre os quimioterápicos mais efetivos e a Doxo, droga antineoplásica do tipo 1, pode ser empregada no tratamento de distintos tipos de malignidades como linfomas de Hodgkin e não - Hodgkin, cânceres de ovário, de mama, de bexiga, de tireoide, de próstata dentre outros, podendo ser usada isoladamente como agente quimioterápico ou em combinação com outras drogas (ADÃO *et al.*, 2013; CURIGLIANO *et al.*, 2020; DOUEDI; CARSON, 2023; VENKATESH; KASI, 2023). Seu uso está relacionado a muitos efeitos adversos, mas o principal fator limitante para seu uso na clínica é a cardiotoxicidade (O'BRIEN *et al.*, 2004).

Estudos apontam que um fator chave para o aparecimento de falha cardíaca relacionada ao uso da Doxo é de fato a dose cumulativa, definida como a quantidade total da droga dada ao paciente ao longo do tempo (PDQ Cancer Information Summaries, 2002). Todavia, tais estudos divergem quanto a especificação da dose correlacionada ao efeito deletério no coração, havendo relatos de diminuição da fração de ejeção do ventrículo esquerdo a partir de 350

mg/m² (ALEXANDER *et al.*, 1979; BUZDAR *et al.*, 1985) e aumento em sua prevalência, acompanhada de sintomatologia clínica, com doses cumulativas de 550 mg/m² (VON HOFF *et al.*, 1979); outros estudos apontaram falha cardíaca em doses ≤300 mg/m² (SWAIN; WHALEY; EWER, 2003) e ainda outros observaram mudanças histopatológicas no tecido cardíaco com doses de 240 mg/m² (BILLINGHAM *et al.*, 1978; BRISTOW *et al.*, 1978).

Habitualmente, a dose dos quimioterápicos é estabelecida com base na área de superfície corporal, sendo seu cálculo feito através da altura e peso do paciente, utilizando-se para o resultado a unidade de m² (KAESTNER; SEWELL, 2007). Todavia, embora em alguns contextos clínicos a área de superfície corporal emergja como um indicador mais preciso da massa metabólica em comparação ao peso corporal, é importante destacar que tal medida tem sido objeto de críticas substanciais na área da quimioterapia (FURLANETTO *et al.*, 2016; PORTUGAL, 2005; STOBÄUS *et al.*, 2013).

Independentemente da unidade de medida a ser usada, é fato que a dose cumulativa associada à cardiotoxicidade é também dependente do organismo de cada indivíduo, assim, pessoas que já possuem comorbidades relacionadas ao sistema cardiovascular estão sob maior risco de complicações advindas do tratamento do que as demais (CURIGLIANO *et al.*, 2020), não havendo portanto um valor (dose da medicação) assertivo relacionado à toxicidade cardíaca. Todavia, pode-se afirmar um aumento na incidência de doenças cardiovasculares de até 26% em doses de 550 mg/m². Assim, até os dias atuais, o fator dose cumulativa objetivando evitar a toxicidade cardíaca tem ditado o tratamento quimioterápico, dentre outras antraciclinas, com a Doxo (ADÃO *et al.*, 2013; CURIGLIANO *et al.*, 2016).

A cardiotoxicidade pode aparecer logo depois do tratamento ou mesmo anos após o término deste, fato de especial importância para os sobreviventes de câncer na infância (CURIGLIANO *et al.*, 2016; VOLKOVA; RUSSELL, 2011). A cardiotoxicidade pode se apresentar como isquemia, hipertensão arterial ou pulmonar, espessamento ou derrame do pericárdio, doença arterial coronariana, arritmias dentre outros (ADÃO *et al.*, 2013; KOUTSOUKIS *et al.*, 2018). A diminuição da fração de ejeção é amiúde citada na definição do que é a cardiotoxicidade; entretanto, faz-se necessário salientar que este é um sinal tardio da cardiotoxicidade e, portanto, não deve ser tomada como parâmetro isolado. Na verdade, a

cardiotoxicidade apresenta distintos estágios, sendo assim necessário uma definição mais abrangente, que expresse a condição da forma com a qual se apresenta (ALEXANDRE *et al.*, 2020).

Uma forma de classificar a cardiotoxicidade é categorizá-la em aguda e crônica. A cardiotoxicidade dita como aguda ocorre durante a administração da terapia ou logo depois, envolvendo anormalidades no ECG tais como prolongamento QT, arritmias, hipotensão, vasodilatação, e mais raro pericardite e miocardite. A cardiotoxicidade aguda independe da dose e pode ser observada no início do tratamento até 14 dias após o término deste (ALKURAISHY; AL-GAREEB; AL-HUSSANIY, 2017).

A cardiotoxicidade crônica, por se tratar de uma injúria progressiva ao cardiomiócito, leva ao afinamento das paredes ventriculares e diminuição da performance sistólica, resultando em insuficiência cardíaca e cardiomiopatia grave. Esse tipo de cardiotoxicidade é dependente da dose, aparece após o término do tratamento, no primeiro ano ou até mesmo anos após o término (ALKURAISHY; AL-GAREEB; AL-HUSSANIY, 2017).

2.5.1 Mecanismos de ação da doxorrubicina

O efeito citotóxico da Doxo em células cancerígenas é atribuído primariamente a interação topoisomerase 2 α -Doxo-DNA, o que bloqueia a replicação de nucleotídeos, leva à quebra do DNA e consequentemente, morte celular (ALKURAISHY; AL-GAREEB; AL-HUSSANIY, 2017; RAWAT *et al.*, 2021). Importante pontuar que tal mecanismo ocorre em dois contextos, o da atividade antitumoral, onde a topoisomerase em questão é a 2 α , amplamente expressa em tumores e minimamente expressa no coração, e o da cardiotoxicidade, onde a topoisomerase em questão é a 2 β , bem expressa no coração (JIANG *et al.*, 2017; UUSKÜLA-REIMAND; WILSON, 2022). Outros mecanismos de cardiotoxicidade também têm sido estudados, como será discorrido nesta seção.

O estresse oxidativo há muito tempo tem sido apontado como um mecanismo no cerne da cardiotoxicidade induzida pela Doxo. Tal mecanismo pode ser oriundo da própria metabolização da Doxo, que ao ser reduzida por enzimas redutases - como por exemplo pela redutase do citocromo P450, NADH desidrogenase e xantina

oxidoredutase, origina o radical Doxo semiquinona (KALYANARAMAN, 2019; RAWAT *et al.*, 2021).

Tais enzimas, que fazem parte do complexo enzimático NOX2, contribuem na formação do radical semiquinona através da transferência de um elétron do NADPH para Doxo que, através de um mecanismo ordinário de ciclo redox, produz radicais livres e leva à peroxidação lipídica seguida de apoptose (RAWAT *et al.*, 2021). Obviamente, para o êxito desse mecanismo de ação, está implícita a presença de um íon metálico como o ferro.

EROs também são capazes de promover a translocação do fator de transcrição NF- κ B para o núcleo, ativando assim diretamente genes apoptóticos como o p53. Outra via desencadeada pelas EROs é o aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular por liberação do Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS) através da abertura do receptor de rianodina (RyR) (ALKURAISHY; AL-GAREEB; AL-HUSSANIY, 2017). O manejo do Ca^{2+} desempenha um importante papel na cardiotoxicidade induzida por Doxo, e sua homeostase também é comprometida por ação direta da Doxo no RS.

A Doxo dilata o RS gerando um estresse neste, comprometendo a homeostase do Ca^{2+} e estimulando sua liberação das vesículas do RS (ALKURAISHY; AL-GAREEB; AL-HUSSANIY, 2017; FU *et al.*, 2016). Tal processo se apoia numa intrincada via de síntese proteica, que de forma mais simplista envolve a ativação de sensores transmembranares responsáveis pelas respostas adaptativas do RS - como por exemplo o ATF6 (fator de transcrição 6), que induzem a expressão de genes cujo mRNA codifica o fator de transcrição para GRP78 (proteína 78 regulada por glicose), chaperona mais abundante do RS e responsável pela resposta adaptativa deste. A Doxo diminui os níveis de mRNA que codifica o fator de transcrição para GRP78, logo, diminui a transcrição de proteínas responsáveis pela resposta adaptativa do RS (FU *et al.*, 2016).

Além da própria metabolização da Doxo gerar espécies reativas que afetam o RS e perturbam a homeostase do Ca^{2+} , o estresse prolongado do RS também leva ao estresse oxidativo, uma vez que o Ca^{2+} intracelular aumentado induz a produção de mais EROs através de enzimas geradoras de EROs sensíveis ao Ca^{2+} (ALKURAISHY; AL-GAREEB; AL-HUSSANIY, 2017; FU *et al.*, 2016). Ainda, vias de sinalização apoptóticas específicas também são iniciadas por esse estresse no RS (FU *et al.*, 2016).

Ambas as situações – estresse oxidativo e aumento de Ca^{2+} intracelular, corroboram para a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPTP), levando à liberação de citocromo c e fator indutor de apoptose (AIF) da mitocôndria, o que em última instância, culmina na morte celular. A apoptose também pode ser devido a lesões no DNA, seja por ação direta da Doxo ou pelas EROs, que conduzem ao aumento da ativação e expressão do gene p53 e das proteínas pró-apoptóticas por ela regulados, como o Bax. Em contrapartida, a Doxo causa depleção do fator de transcrição GATA-4, responsável por regular a expressão de genes específicos do coração, como as proteínas sarcoméricas, além de ativar o gene antiapoptótico Bcl XL (ALKURAISHY; AL-GAREEB; AL-HUSSANIY, 2017; TAKEMURA; FUJIWARA, 2007).

A Doxo, por ser uma molécula com carga positiva, possui grande afinidade com a mitocôndria do cardiomiócito, na verdade, ela forma complexos irreversíveis com a cardiolipina, alterando assim seu funcionamento e originando o radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Ainda, o estresse oxidativo causado pela Doxo aumenta o metabolismo anaeróbico e aeróbico, o que pode levar à insuficiência cardíaca ou prejudicar a contratilidade e relaxamento (RAWAT *et al.*, 2021).

A sobrecarga de trabalho mitocondrial impacta na sua biogênese, o que é refletido no aumento da massa e da função mitocondrial. Em cardiomiócitos, o aumento da biogênese mitocondrial é alcançado através do aumento da expressão do coativador gama 1-alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissomo (PGC-1 α) e coativador gama 1-beta do receptor ativado por proliferador de peroxissomo (PGC-1 β), da família PGC1 - proteína coativadora que ativa fatores de transcrição que induzem a expressão de genes da maioria das proteínas da cadeia respiratória. A Doxo diminui a expressão de PGC1, o que implica diretamente na capacidade oxidativa da mitocôndria - prejudica a cadeia de transporte de elétrons, gera EROs e leva ao estresse oxidativo. De forma mais pontual, pode-se sinalizar a PGC-1 α , que é mais expressa em tecidos com alto metabolismo como os cardiomiócitos (ROWE *et al.*, 2010; WALLACE; SARDÃO; OLIVEIRA, 2020).

Ainda, o Ca^{2+} e o estresse oxidativo podem ativar a CaMKII, que nos cardiomiócitos desempenha papéis fundamentais na sinalização celular. A ativação da CaMKII e o próprio aumento do Ca^{2+} ativam o NF- κ B, que, como dito anteriormente, desencadeia vias apoptóticas. A Doxo também aumenta a probabilidade de abertura do CaL através de sua fosforilação direta, ocasionando

maior entrada de Ca^{2+} , responsável pela ativação da CaMKII, que por sua vez, também aumenta a probabilidade de abertura do CaL (IKEDA *et al.*, 2019).

Outra atividade desempenhada pela CaMKII quando ativada é a inibição da fosfolambam (PLB) (MATTIAZZI; KRANIAS, 2014), proteína inibidora fisiológica da ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA). A SERCA contribui com a homeostase do Ca^{2+} por recaptá-lo do citosol para o RS (AKIN *et al.*, 2013); assim, a regulação negativa da PLB implica num aumento de recaptação de Ca^{2+} pela SERCA.

O aumento do Ca^{2+} pela ação da Doxo, direta ou indiretamente, na $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ e RS promove ainda a ativação das calpaínas - proteases dependentes de Ca^{2+} que induzem apoptose nos cardiomiócitos, além de promover a degradação da titina (RAWAT *et al.*, 2021). A titina é uma proteína integral do miofilamento, grande e elástica, que ancora os filamentos grossos às linhas Z. Dessa forma, a titina não apenas evita o estiramento excessivo do sarcômero, mas também participa na sinalização celular atuando como um sensor de estiramento, modulando a síntese proteica em resposta ao estresse. Defeitos genéticos na titina causam disfunção cardíaca, fato que comprova o papel essencial dela no sarcômero (UPADHYAY *et al.*, 2021).

Ainda em relação ao sistema contrátil cardíaco, a Doxo diminui a quinase da cadeia leve da miosina (cMLCK), responsável por fosforilar a cadeia leve da miosina (MLC2) e assim aumentar a sensibilidade da MLC2 ao Ca^{2+} , aumentando a amplitude de contração e cinética contração/relaxamento. A atividade da cMLCK pode estar ou não ligada a CaMKII, PKA, PKC (UPADHYAY *et al.*, 2021).

O estresse oxidativo na cardiotoxicidade induzida pela Doxo segue sendo amplamente estudado, considerando a suscetibilidade do coração às EROs e ERNs, que chega a ser 10 vezes maior que em outros órgãos (RAWAT *et al.*, 2021). De fato, o estresse oxidativo está presente na cardiotoxicidade induzida pela Doxo; todavia, a literatura ainda não chegou a um consenso quanto a este ser fator causal ou consequente.

Alguns outros mecanismos de ação também são recorrentes na cardiotoxicidade induzida pela Doxo, como por exemplo as vias inflamatórias ativadas pelo Ca^{2+} , NF- κ B e CaMKII, que aumentam, dentre outros, a caspase 3 clivada, citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e as

interleucinas 1 e 6 (IL1, IL6), promovendo um ambiente pró-inflamatório que culmina com o evento apoptótico (IKEDA *et al.*, 2019; RAWAT *et al.*, 2021).

A Doxo também suprime a via AMPK no coração, reduzindo a atividade da Acetil-coA carboxilase e conduzindo a vias alternativas como as da Akt e MAP quinase, provocando danos ao DNA além de aumentar o estresse energético no cardiomiócito. Autofagia, vias distintas de apoptose (intrínsecas e extrínsecas) e componentes genéticos também têm sido investigados, além de muitos outros putativos mecanismos (GHIGO; LI; HIRSCH, 2016; LIU *et al.*, 2007; RENU *et al.*, 2018; TIMM; TYLER, 2020). Alguns dos mecanismos de ação aqui contemplados podem ser vistos na Figura 07.

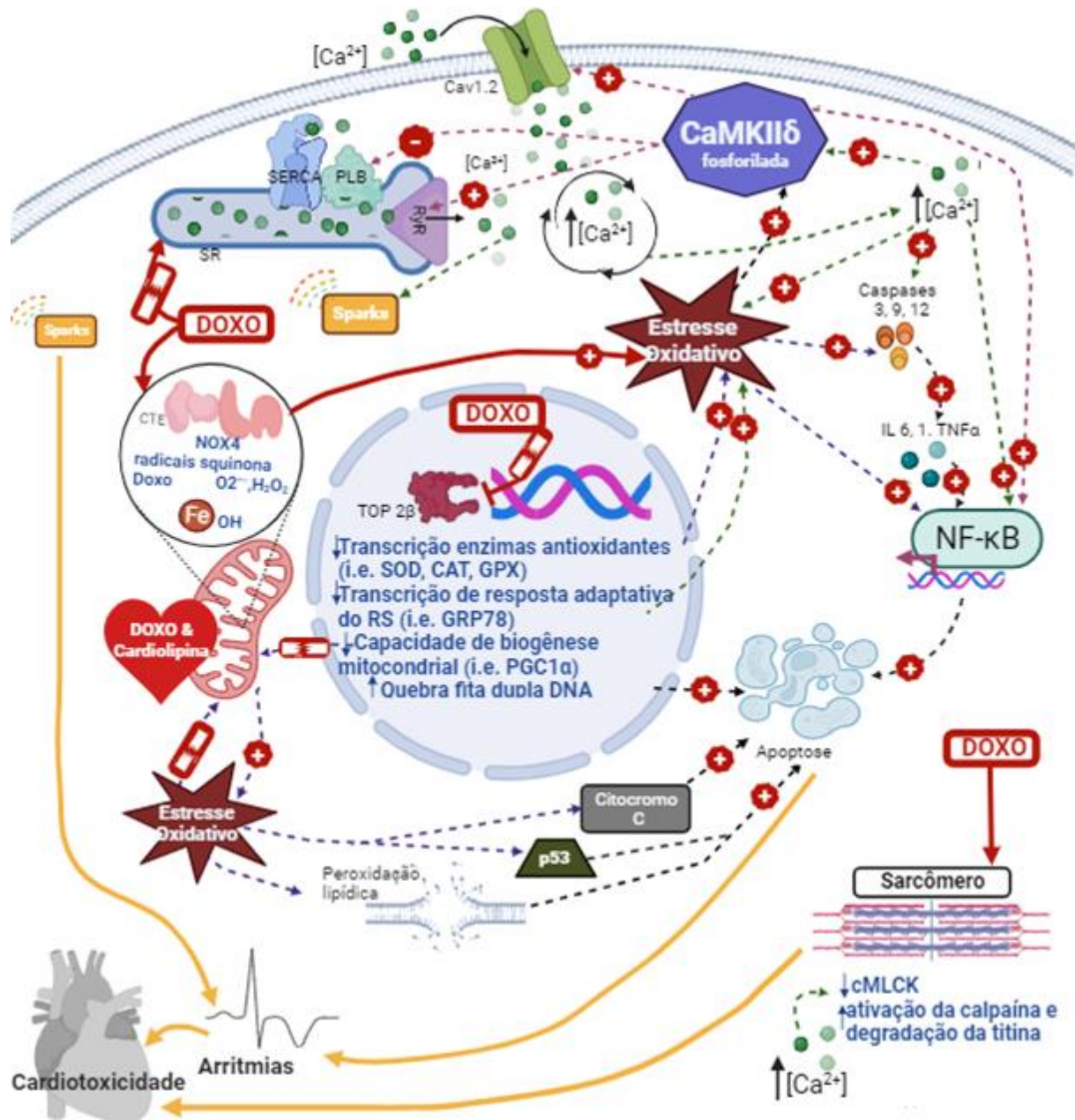


Figura 07. Mecanismos de cardiotoxicidade da Doxorubicina. No núcleo, a doxo interage com a topoisomerase (TOP) 2 β e forma complexos cliváveis de DNA, diminui a transcrição de enzimas antioxidantes, diminui a transcrição de proteínas responsáveis pela resposta adaptativa do retículo sarcoplasmático (RS) e a biogênese mitocondrial, condições que contribuem, direta e indiretamente, com o estresse oxidativo e apoptose e interfere no manejo do Ca^{2+} . A alteração no Ca^{2+} pode ser provocada pela quinase II dependente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII), que ativada (i.e. estresse oxidativo) fosforila o cálcio tipo L e inibe a fosfolambam (PLB), ambas as situações contribuem com o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e levam a um feedback

positivo de ativação da CaMKII e stress oxidativo. A CaMKII, o Ca^{2+} e o estresse oxidativo ativam vias inflamatórias que contribuem com a apoptose. Na mitocôndria, a doxo tem ação direta na cadeia de transporte de elétrons e forma ligação irreversível com a cardiolipina, condições que contribuem com o estresse oxidativo e apoptose. Nos elementos contráteis, há diminuição da quinase da cadeia leve da miosina (cMLCK) pela doxo e dano ao miofilamento pela calpaína, prejudicando a cinética contração/relaxamento. Doxo: doxorubicina; SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GPx: glutathione peroxidase; GRP78: proteína 78 regulada por glicose; PGC-1 α : coativador gama 1-alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissomo. Fonte: Durço, A. O. 2023. Criado com BioRender.com.

A Doxo, devido a sua efetividade, se mantém como uma das drogas mais utilizadas no tratamento contra o câncer, a despeito de sua cardiotoxicidade - problema este que até o momento possui apenas um tratamento específico, o dexrazoxane. O dexrazoxane é administrado intravenosamente em caráter preventivo; todavia, seu uso é controverso já que o mesmo pode ser responsável por causar mielossupressão, além de uma possível interferência no mecanismo antitumoral da Doxo (SEIFERT; NESSER; THOMPSON, 1994); assim, seu uso não é amplamente aceito ou praticado. Logo, cada vez mais pesquisas com escopo na prevenção e tratamento da cardiotoxicidade induzida por Doxo têm sido produzidas, com atenção especial nos produtos naturais. Tais produtos possuem propriedades terapêuticas valiosas, e.g. anti-inflamatórias, antiapoptóticas, antioxidantes, e geralmente são menos onerosas que os fármacos “convencionais” (ABUSHOUK *et al.*, 2017). Portanto, esses produtos possuem ação em múltiplas vias pelas quais a Doxo leva à cardiotoxicidade, sendo então uma fonte promissora para o desenvolvimento de agentes capazes de atuar na cardiotoxicidade induzida por Doxo.

2.6 Terpenos

Produtos naturais são utilizados com finalidade terapêutica há milênios por distintas sociedades. Os terpenos são os metabólitos vegetais mais recorrentes na natureza, desempenhando nas plantas funções diversas como desenvolvimento e

defesa (COX-GEORGIAN *et al.*, 2019), e possuem grande representatividade na indústria agrícola, cosmética, alimentícia e farmacêutica (LAPCZYNSKI *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2015; PAZOUKI; NIINEMETS, 2016).

Os terpenos são metabólitos secundários presentes em várias partes do vegetal e podem ser apresentados em óleos, álcoois ou outros derivados oxigenados. Sua classificação se dá conforme o número da unidade estrutural de isoprenos, sendo a base da unidade isoprênica 5 carbonos (C5). Assim, os terpenos são denominados como hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30), tetraterpenos (C40) e politerpenos (mais que 40 carbonos, ou seja, mais que oito unidades isoprênicas). Ainda em termos de estrutura, os terpenos também podem ser classificados em acíclicos e cíclicos, quando a estrutura apresenta-se de forma linear e em forma de um anel, respectivamente (ALDRED; BUCK; VALL, 2009; CHO *et al.*, 2017; PAZOUKI; NIINEMETS, 2016).

Muitos estudos já comprovaram propriedades anti-inflamatórias dos terpenos, como a redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 e IL-6, inibição do NF- κ B, redução da lipoperoxidação e formação de EROs, além de aumentar a atividade de enzimas antioxidantes como a catalase e superóxido dismutase (DEL PRADO-AUDELO *et al.*, 2021). Algumas características químicas dos terpenos contribuem para tal atividade antioxidante.

Os terpenos contêm grupos funcionais antioxidantes, como hidroxilas (-OH), cetonas (C=O), aldeídos (R-CHO), e éteres, que são frequentemente associados à atividade antioxidante devido a capacidade de doar elétrons para neutralizar radicais livres. Ainda, a presença de ligações duplas (insaturações) na cadeia de terpenos também pode contribuir para a atividade antioxidante, uma vez que essas ligações podem ser alvos de radicais livres, ajudando a neutralizá-los (SÁNCHEZ-MARZO *et al.*, 2019).

Embora terpenos de variados tamanhos exibam atividade antioxidante, sugere-se que aqueles de menor tamanho, como monoterpenos, podem ser mais eficazes devido à sua capacidade de interagir mais facilmente com radicais livres (SÁNCHEZ-MARZO *et al.*, 2019). Outras atividades terapêuticas também são apresentadas, por exemplo, os monoterpenos mirceno e D-limoneno possuem atividade anti-tumorigênica, sendo atualmente um dos metabólitos do D-limoneno, o

álcool perfílico, administrado em seres humanos no tratamento de tumor cerebral (CHO *et al.*, 2017; DURÇO *et al.*, 2021).

No sistema cardiovascular há também uma variedade de evidências na pesquisa básica que suportam os efeitos cardioprotetores dos terpenos em doenças isquêmicas, insuficiência cardíaca, hipertensão, arritmias dentre outros (ALVES-SILVA *et al.*, 2016; DURÇO *et al.*, 2019; NASCIMENTO *et al.*, 2019).

Os monoterpenos, que como dito são os compostos constituídos por duas unidades de isopreno - C₁₀, são a parte majoritária dos terpenos, representando nos óleos essenciais 90% de seus componentes (TCHIMENE *et al.*, 2013; VIEIRA *et al.*, 2018). Tal como os terpenos, os monoterpenos resultam do metabolismo secundário das plantas e podem estar contidos no caule, folhas, frutos e flores; são lipofílicos e, em decorrência do seu baixo peso molecular, voláteis (BUCKLE, 2003). Os monoterpenos são amplamente utilizados na indústria de alimentos, agricultura e perfumaria; sendo reconhecidamente compostos que possuem propriedades terapêuticas – anti-inflamatórias, antidepressivas, hipotensivas, antimicrobianas dentre outras (BUCKLE, 2015; COX-GEORGIAN *et al.*, 2019; TCHIMENE *et al.*, 2013).

2.6.1 Limoneno

O limoneno (p-menta-1,8-dieno) é o monoterpeno natural de maior recorrência na natureza e está presente, especialmente, na casca de plantas cítricas – em maior quantidade nos óleos essenciais, podendo também ser encontrado em menor proporção em alguns legumes (BACANLI *et al.*, 2017; BACANLI, 2020). O monoterpeno cíclico limoneno possui 2 (dois) isômeros, o L-limoneno ou S-limoneno e o D-limoneno ou R-limoneno (DL) (Figura 08), sendo o DL sua principal forma ativa e, portanto, o maior componente do óleo essencial de frutas cítricas (BACANLI, 2020; KIM *et al.*, 2013).

Em decorrência do seu aroma cítrico, o DL foi inicialmente alvo da indústria alimentícia e cosmética, sendo utilizado como saborizante e odorizante em alimentos, gomas de mascar, bebidas, além de perfumes, solventes, sabões dentre outros (BACANLI *et al.*, 2017; FALK FILIPSSON; BARD; KARLSSON, 1998). Assim, considerando a presença do DL tanto em alimentos naturais quanto como aditivo de sabor, estima-se que a ingestão desse monoterpeno, cuja segurança (alimentar) é

reconhecida por órgãos federais, alcance uma média diária de 16 a 90 mg/dia (SUN, 2007).

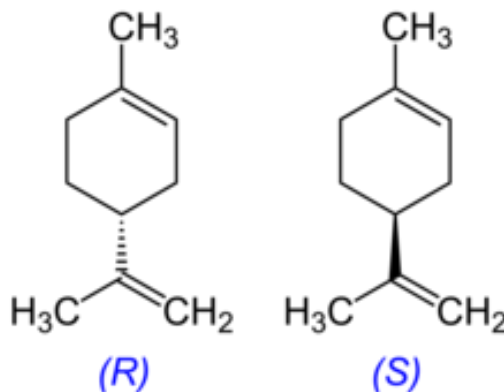


Figura 08. Estrutura química do D (R) - limoneno e L (S) - limoneno. Fonte: Encyclopedia of Toxicology, 2014.

Em murinos e humanos, a metabolização do DL é similar. Em murinos, a concentração do DL reduz rapidamente após a primeira hora de ingestão, sendo seus principais metabólitos (no plasma e urina) os ácidos perílico e dihidroperílico. Tanto o DL quanto seus metabólitos podem ser encontrados em distintos tecidos como pulmão, rim e fígado, com propensão de acúmulo em tecidos adiposos (BACANLI, 2020; CROWELL *et al.*, 1992).

No organismo humano, o DL é totalmente metabolizado após aproximadamente 5h da ingestão, sendo alguns de seus metabólitos o ácido perílico, álcool perílico e ácido dihidroperílico. Seus metabólitos são detectáveis no sangue e na urina, tendo os produtos da diidroxilação endocíclica maior representação no sangue e aqueles resultantes da diidroxilação exocíclica, na urina – atingindo os produtos de todas as vias metabólicas um pico máximo dentro de até 3h após a exposição, com cinética de eliminação diretamente proporcional à concentração da substância (BACANLI, 2020; KIM *et al.*, 2013; SCHMIDT; GÖEN, 2017).

Assim, no trato gastrointestinal (TGI) de humanos e roedores o DL é metabolizado por distintos tecidos, o que garante uma rápida absorção. Seus metabólitos divergem em concentração e toxicidade (CROWELL *et al.*, 1994), sendo os sintomas de toxicidade reportados restritos à irritação dérmica (quando DL aplicado topicamente) e ao TGI – como por exemplo tenesmo, e cessam após sua descontinuação. Ainda assim, a toxicidade do DL é considerada muito baixa e ele

não confere alteração funcional em órgãos como fígado, pâncreas e rim (SUN, 2007).

Algumas das propriedades terapêuticas do DL já bem descritas na literatura incluem sua atividade antitumoral (em distintos tipos de malignidades) por inibição da proliferação celular através da regulação de proteínas envolvidas no ciclo celular (SHAH *et al.*, 2018), antioxidante (NEBIGIL; DÉSAUBRY, 2018; VIEIRA *et al.*, 2018), anti-inflamatória, por inibir produção de mediadores inflamatórios como prostaglandinas, e antiapoptótica, por ativação de caspases (VIEIRA *et al.*, 2018), dentre muitas outras (VIEIRA *et al.*, 2018). Clinicamente em humanos, foi comprovado seu uso para dissolver pedra na vesícula (coledocolitíase), tratar azia/refluxo e para aumentar a velocidade de absorção da via transdérmica (SHOJAEI *et al.*, 2014; SUN, 2007), além de estar sendo estudado como tratamento para o câncer (QIAN, 2023; CLINICAL TRIALS, 2023).

No sistema cardiovascular, o DL demonstrou propriedades bradicárdica, hipotensora e antiarrítmica, além de melhorar lesões miocárdicas causadas por infarto (DURÇO *et al.*, 2019; NASCIMENTO *et al.*, 2019; PARK *et al.*, 2011; TOUVAY *et al.*, 1995; WANG; LI; SHEN, 2018; YOUNIS, 2020).

Na toxicidade induzida por Doxo, o DL demonstrou proteção renal por prevenir o estresse oxidativo e diminuir as respostas inflamatória e de biomarcadores de lesão renal (REHMAN *et al.*, 2014). Mais especificamente na cardiotoxicidade induzida por Doxo, frutas que contêm o DL, e.g. romã e toranja, demonstraram restaurar o equilíbrio redox por reduzir a lipoperoxidação e restaurar a atividade de enzimas antioxidantes como a SOD e a GSH (KOSS-MIKOŁAJCZYK *et al.*, 2021). Em tais estudos, o DL foi administrado por via oral, misturado na dieta ou por gavagem, e em sua forma pura.

Assim, alguns mecanismos de ação nos distintos escopos pelos quais o DL exerce suas atividades protetoras, estão relacionados ao impedimento do estresse oxidativo, inibição de vias apoptóticas induzidas por espécies reativas, aumento da atividade de enzimas antioxidantes, diminuição de marcadores inflamatórios dentre outros (ALSFAFFAR *et al.*, 2022; ANANDAKUMAR; KAMARAJ; VANITHA, 2021).

A última qualidade do DL aqui abordada é relacionada a sua obtenção. O DL é largamente encontrado no gênero *Citrus*, que engloba as frutas mais cultivadas no mundo (VIEIRA *et al.*, 2018). O Brasil é um dos maiores produtores de laranja do mundo (FAO, 2021), o que torna o DL amplamente acessível.

Todavia, por ser uma molécula hidrofóbica passível de sofrer oxidação, o DL possui baixa solubilidade aquosa e alta volatilidade, como a maioria dos monoterpenos - o que limita seu uso terapêutico. Assim, recursos capazes de contornar essa limitação podem melhorar a biodisponibilidade do DL, por exemplo, alguns trabalhos já mostraram que a complexação de DL com β -ciclodextrinas é capaz de melhorar significativamente as suas propriedades terapêuticas (BARRETO *et al.*, 2017; MARINHO *et al.*, 2022; PEREIRA *et al.*, 2022).

2.7 Ciclodextrina

As ciclodextrinas (CDs) são resultantes da hidrólise enzimática do amido pela enzima ciclodextrina glicosiltransferase. Estruturalmente, a molécula assemelha-se a um cone, com grupos hidroxilas em ambas as extremidades desta estrutura (grupos primários na parte estreita e grupos secundários na região mais larga do cone), cujo centro é lipofílico e a parte externa é hidrofílica.

As CDs naturais mais numerosas são as α , β , e γ CDs (LOFTSSON; MASSON, 2001). A α e a γ CDs não se adequam às necessidades da indústria por, respectivamente, possuir um tamanho de cavidade inadequado para muitas drogas e ser onerosa. Assim, a β -ciclodextrina (β -CD) é a mais utilizada na indústria farmacêutica, pois sua cavidade é compatível com uma maior quantidade de drogas – o que a torna melhor para complexação, além de possuir um baixo custo. Todavia, o uso da β -CD não está livre de óbices.

A β -CD forma ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas, e isso reduz os grupos de hidroxila disponíveis para fazer ligação com o hidrogênio das moléculas de água, o que limita a sua solubilidade. Ainda, além de ser nefrotóxica, a β -CD quando complexada com compostos lipofílicos geralmente leva à precipitação complexos da ciclodextrina (CHALLA *et al.*, 2005; LOFTSSON; MASSON, 2001), o que restringe o seu uso especialmente em vias parenterais. Logo, foram desenvolvidas modificações químicas visando a redução do potencial tóxico e a substituição das ligações de hidrogênio que resultam em grupos hidroxil para consequente melhora da solubilidade aquosa.

Esse é o caso da hidroxipropil- β -ciclodextrina (H β CD), que é obtida através da adição de óxido de propileno - ou seja, a presença do radical hidroxipropil na estrutura resulta num sistema de alta solubilidade. A formação do complexo com o

composto lipofílico (H β CD + droga) no ambiente aquoso acontece em especial pela entalpia de formação: as moléculas de água que estão na cavidade central, que é lipofílica, não conseguem cumprir o potencial de ligação do hidrogênio, logo, estas possuem uma entalpia maior do que as várias moléculas de água presentes no ambiente aquoso; tais moléculas ricas em entalpia são liberadas da cavidade da CD e substituídas pela molécula do composto lipofílico ou por alguma estrutura lipofílica deste composto (LOFTSSON; MASSON, 2001). Ainda, mesmo em altas doses, a H β CD não apresenta nefrotoxicidade (CHALLA *et al.*, 2005).

Nesse contexto, a H β CD parece ser uma alternativa viável, que não apenas consegue manter as características desejáveis da β CD, mas também contornar os obstáculos que inviabilizam uma complexação mais versátil nesta.

Como visto, a complexação com CD resulta em aumento da solubilidade aquosa por reduzir a cristalinidade do fármaco, fato que contribui para a redução da quantidade terapêutica ideal do fármaco, ou seja, aumenta a eficácia deste uma vez que ele poderá ser usado em doses mais baixas. Tal consideração é de especial importância se o fármaco for tóxico dependente (CHALLA *et al.*, 2005). Ainda, a complexação com CD otimiza o fármaco *per se* ao passo que melhora sua estabilidade - por exemplo, atuando contra oxidação e fotossensibilidade, o que torna a hidrólise do fármaco complexado mais lenta (estável) e contribui com o aumento da proteção conferida por este.

Pesquisas têm demonstrado que a complexação de produtos naturais com H β CD foi capaz de melhorar as respostas das substâncias estudadas (CAMPOS *et al.*, 2019; LIMA *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2013). As CDs são consideradas seguras por distintos órgãos federais e já são utilizadas na indústria farmacêutica (LOFTSSON; BREWSTER, 2010; UEKAMA; HIRAYAMA; IRIE, 1998). Ainda, a complexação de produtos naturais (incluindo o limoneno) com ciclodextrinas, além de ser um processo relativamente fácil, tem sido realizada com grande êxito pelo grupo de pesquisa ao qual este projeto é vinculado, tendo obtido altas taxas de rendimento dos complexos de inclusão, com otimização dos efeitos benéficos do produto natural e redução de sua dose terapêutica em distintos contextos (PEREIRA *et al.*, 2022; QUINTANS-JÚNIOR *et al.*, 2013; RF LINS *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2021).

2.8 Docking Molecular

Docking molecular é a técnica que prediz a interação entre 2 moléculas. Essa interação pode aumentar ou inibir a função biológica da molécula analisada. Para entender a funcionalidade desta ferramenta, é necessário nos familiarizarmos com ao menos dois termos: receptor - reconhece e se associa de maneira específica a uma molécula, conhecida como ligante, e por sua vez, ligante - molécula complementar que se une ao receptor, promovendo uma resposta biomolecular eficaz (ROY; KAR; DAS, 2015).

Logo, o docking é uma técnica de modelagem molecular projetada para identificar a conformidade ideal entre um ligante e seu sítio de ligação (receptor). Essa abordagem tem sido amplamente empregada em diversos estágios do processo de *design* e descoberta de fármacos, seja para prever o padrão de ligação (ligante já conhecido) ou descobrir novos ligantes (KOLB *et al.*, 2009; ROY; KAR; DAS, 2015).

O método escrutina as possíveis conformações e orientações da proteína emparelhada com o ligante, além de fornecer um valor que indica a viabilidade da interação – a energia livre de ligação. A previsão da energia livre de ligação é calculada correlacionando a energia das estruturas dos receptores e ligantes, considerando suas formas ligadas e não ligadas (ORTIZ *et al.*, 1995; STANZIONE; GIANGRECO; COLE, 2021; WADE; ORTIZ; GAGO, 1998). Assim, a finalidade central dessa técnica consiste na compreensão e previsão do reconhecimento molecular entre ligante e receptor, abordando ambos os aspectos estruturais e de afinidade de ligação (energia).

Os alvos moleculares (ligantes) elegidos para o docking molecular dessa pesquisa foram escolhidos considerando-se a ação dos produtos naturais em várias vias de sinalização dependentes de Ca^{2+} (RZAJEW; RADZIK; REBAS, 2020). A homeostase do Ca^{2+} pode ser influenciada através da alteração na expressão de canais de cálcio, incluindo CaL, diminuição na concentração intracelular de Ca^{2+} , inibição da corrente de cálcio dependente de voltagem, prevenção/redução da ação de enzimas associadas às vias de sinalização do Ca^{2+} , dentre outros (DE MENEZES-FILHO *et al.*, 2014; RZAJEW; RADZIK; REBAS, 2020; SILVA *et al.*, 2022; VATANPARAST; BAZLEH; JANAHMADI, 2017).

Em pesquisas de neuroproteção, o linalol inibiu a atividade da calpaína, uma protease dependente de cálcio que, no músculo, é responsável por clivar várias

proteínas do miofilamento. Já o composto natural paeoniflorina, demonstrou capacidade de neuroproteção por possível inibição da ativação da CAMKII (RZAJEW; RADZIK; REBAS, 2020).

Na cardiotoxicidade induzida por Doxo, percebeu-se interferência tanto em elementos contráteis, como a cMLCK, como em proteína de cascata de sinalização, como a CAMKII. Portanto, visando uma maior abrangência nas possibilidades de ação do DL, considerou-se para alvos de interação com o mesmo a quinase de cadeia leve de miosina, membro 4 (Mylk4), quinase largamente expressa no coração e independente de Ca^{2+} /calmodulina (CHANG *et al.*, 2016), e a quinase II estimulada por cálcio/calmodulina (CaMKII).

2.9 Hipótese

Considerando as distintas vias pelas quais a Doxo leva à cardiotoxicidade, percebe-se a necessidade de um medicamento que possa atuar em múltiplos alvos, característica esta exibida por produtos naturais; dentre os quais o DL mostra-se promissor em doenças que acometem o sistema cardiovascular, inclusive na toxicidade induzida por Doxo. Embora tenha se encontrado estudo que sugere um potencial efeito cardioprotetor do DL no contexto da cardiotoxicidade induzida pela Doxo (SELVANATHAN; SALAM, 2017) seus desdobramentos estão longe de serem esgotados, sendo portanto a hipótese deste trabalho pautada na ação cardioprotetora do DL complexado com H β CD na cardiotoxicidade induzida por Doxo.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Investigar, através de ensaio experimental, o efeito cardioprotetor do complexo de inclusão D-limoneno-hidroxipropil- β -ciclodextrina (H β DL) na cardiotoxicidade induzida por Doxorubicina.

3.2 Objetivos específicos

1. Identificar uma dose de H β DL com melhor resposta sobre os biomarcadores de lesão cardíaca frente a cardiotoxicidade induzida por Doxo, comparando com a resposta do DL puro;

Após a determinação da melhor dose, avaliar em modelo animal de cardiotoxicidade induzida pela doxo:

2. Peso corporal;
3. Danos histológicos cardíacos;
4. Parâmetros eletrocardiográficos e suscetibilidade a arritmias *in vivo* e *in vitro*;
5. Potencial de ação ventricular em cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo;
6. Transiente de cálcio intracelular em cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo;
7. Corrente de cálcio tipo L em cardiomiócito ventricular esquerdo
8. Contratilidade celular em cardiomiócito ventricular esquerdo;
9. Expressão proteica da CaMKII em suas formas total e ativada por fosforilação e oxidação;
10. Geração de espécie reativa citoplasmática e mitocondrial em cardiomiócito ventricular esquerdo;
11. Participação da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase na geração de espécie reativa;
12. Atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx em homogenato de tecido cardíaco ventricular;
13. Lipoperoxidação em homogenato de tecido cardíaco ventricular;
14. Marcadores de apoptose através da expressão das proteínas Bax, caspase 3 e Bcl-2;
15. A interação molecular do DL com os possíveis alvos CAMKII e cMLCK.

4 Material e Métodos

4.1 Complexo de inclusão

O complexo de inclusão foi preparado e caracterizado no Laboratório de Ensaios Farmacêuticos e Toxicidade (LeFT/UFS), coordenado pelo Prof. Dr. Adriano Antunes de Souza Araújo.

O composto DL (pureza de 97%, # MKCB4024) e a hidroxipropil- β -ciclodextrina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A preparação do complexo de inclusão (denominado H β DL) foi conduzida por Marinho et al. (2022), utilizando a técnica de complexação em *slurry*, proporção molar 1:1 de DL e HP β CD, com base nos pesos moleculares dessas substâncias, pelo método de liofilização (ANDRADE *et al.*, 2017; MARINHO *et al.*, 2022).

A confirmação da formação do complexo de inclusão foi realizada por meio de calorimetria de varredura diferencial e difratometria de raios X de pó, enquanto as alterações no deslocamento químico foram avaliadas por ressonância magnética nuclear de prótons. A eficiência de complexação - EC (%) foi calculada pela razão entre a quantidade experimental de DL, isto é, quantidade de DL extraída do complexo de inclusão, dividida pela quantidade teórica de DL que corresponde à quantidade de DL inicialmente utilizada para preparar o complexo. A EC alcançou $79,96 \pm 0,24\%$, significando uma quantidade de $\sim 0,73$ mg de DL no complexo de 10 mg de H β DL (MARINHO *et al.*, 2022), conforme exemplificado abaixo. DL e H β DL foram diluídos em DMSO (0,1%) e solução salina (NaCl 0,9%), respectivamente.

Peso Molar

DL: 136,24	}	Numa razão molar de 1:1, se a EC fosse 100%, a cada 1516 do complexo, haveria 136,24 do DL
HP β CD: 1380		

136,24 ---- 100%	}	Numa EC de 80%, a cada 1516 do complexo, há 108,99 do DL
x ---- 80%		
X = 108,99		

1516 ---- 108,99	}	Numa EC de 80%, numa dose de 10mg/kg do complexo (dose utilizada no trabalho), há uma concentração aproximada 0,73mg/ml do DL
10 ---- x		
X $\approx$ 0,73		

4.2 Animais, tratamentos e delineamento

Inicialmente, obteve-se aprovação nos Comitês de Ética e Pesquisa Animal (CEPA) das Universidades Federais de Sergipe (UFS) e de São Paulo (#5197101120 e #4930280223). Na Universidade Federal de Minas Gerais utilizou-se o mesmo CEPA da UFS. Camundongos Swiss machos, entre 25 e 35 g, foram obtidos no Biotério Setorial das Universidades Federais de Sergipe, Minas Gerais e São Paulo. Os animais foram mantidos em caixas apropriadas, com preservação do ciclo claro/escuro 12h (claro: 6h às 18 h) e ambiente com temperatura controlada (20°C a 25°C), alimento e água *ad libidum*. Para a quantidade de animais por grupo, fora considerada a quantidade mínima necessária sinalizada em periódicos específicos da área de farmacologia (KILKENNY *et al.*, 2010; SERT *et al.*, 2020).

Os medicamentos foram administrados intraperitonealmente (i.p.), conforme segue:

Para a indução da cardiotoxicidade: Doxorubicina (Doxo) - dose cumulativa de 20 mg/kg. Administração de 1 dose de 5 mg/kg a cada 5 dias, até alcançar a dose cumulativa de 20 mg/kg. A dose utilizada se assemelha ao esquema de tratamento em muitos estudos de cardiotoxicidade induzida por Doxo em modelo animal (PODYACHEVA *et al.*, 2021), representando uma dose equivalente humana de ~1,6 mg/kg, que convertido em mg por superfície corpórea perfaz ~60 mg/m², dose que retrata a prática clínica (REAGAN-SHAW, 2007; CAVES; NEUENSCHWANDER, 2012; PDQ Ovarian Epithelial, Fallopian Tube, and Primary Peritoneal Cancer Treatment, 2023; NAIR; JACOB, 2016; PODYACHEVA *et al.*, 2021).

Para investigação do melhor tratamento: D-limoneno (DL) (10 mg/kg) e DL complexado com hidroxipropil- β -ciclodextrina (H β DL) (10 mg, 30 mg e 100 mg/kg), administrados 30 minutos antes da Doxo, tempo suficiente para a absorção de substância na cavidade peritoneal (AL SHOYAIB; ARCHIE; KARAMYAN, 2019).

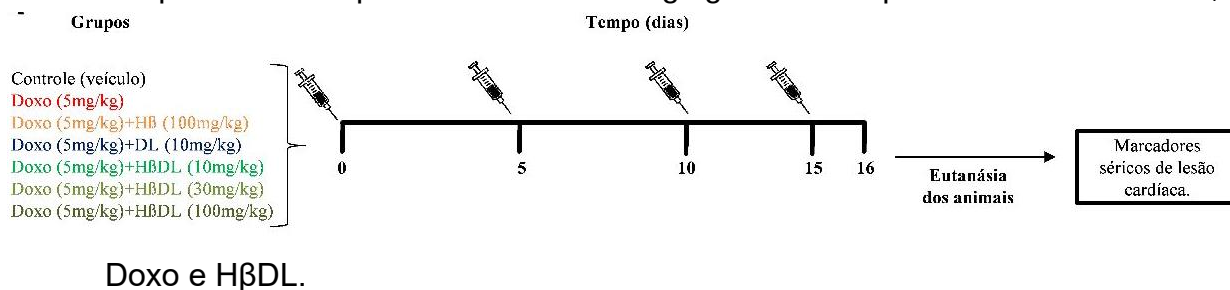
Para controle do complexo: hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) 100 mg/kg, administrado 30 minutos antes da Doxo.

Os animais foram divididos em grupos Controle, Doxo, Doxo + DL (10 mg/kg), Doxo + HP β CD 100 mg/kg, Doxo + H β DL 10 mg/kg, Doxo + H β DL 30 mg e Doxo + H β DL 100 mg/kg. Um esquema com grupos e tratamentos pode ser visto na Figura 09.

Dessa feita, seguiu-se o delineamento experimental:

- Grupo controle: animais que receberam veículo.

- Grupo Doxo: animais que receberam veículo e Doxo.
- Grupo Doxo + DL na dose 10 mg/kg: animais que receberam veículo, Doxo e DL.
- Grupo Doxo + HP β CD na dose 100 mg/kg: animais que receberam veículo, Doxo e HP β CD.
- Grupo Doxo + H β DL na dose 10 mg/kg: animais que receberam veículo, Doxo e H β DL.
- Grupo Doxo + H β DL na dose 30 mg/kg: animais que receberam veículo, Doxo e H β DL.
- Grupo Doxo + H β DL na dose 100 mg/kg: animais que receberam veículo,



Doxo e H β DL.

Figura 09. Delineamento experimental. Grupos, tratamentos e experimentos para escolha do tratamento H β DL que proporcionou menor toxicidade. Fonte: Durço, A. O., 2023.

No dia seguinte ao término do tratamento (16º dia) realizou-se testes de avaliação da lesão cardíaca através dos biomarcadores creatina kinase fração MB (CK-MB) e lactato desidrogenase (LDH), e escolheu-se o H β DL na dose 10 mg. Assim, para responder aos demais objetivos do projeto, os grupos foram refeitos como Controle, Doxo e Doxo + H β DL 10 mg/kg, como segue:

- Grupo controle: animais que receberam veículo.
- Grupo Doxo: animais que receberam veículo e Doxo.
- Grupo Doxo + H β DL na dose 10 mg: animais que receberam veículo, Doxo e H β DL.

A Figura 10 representa o delineamento experimental. Os procedimentos de avaliação dos variados ensaios e análise estatística ocorreram sob cegamento. Houve um curto período (16 dias) entre o início do tratamento e a eutanásia dos animais, ainda assim, foi realizado análise comportamental dos mesmos.

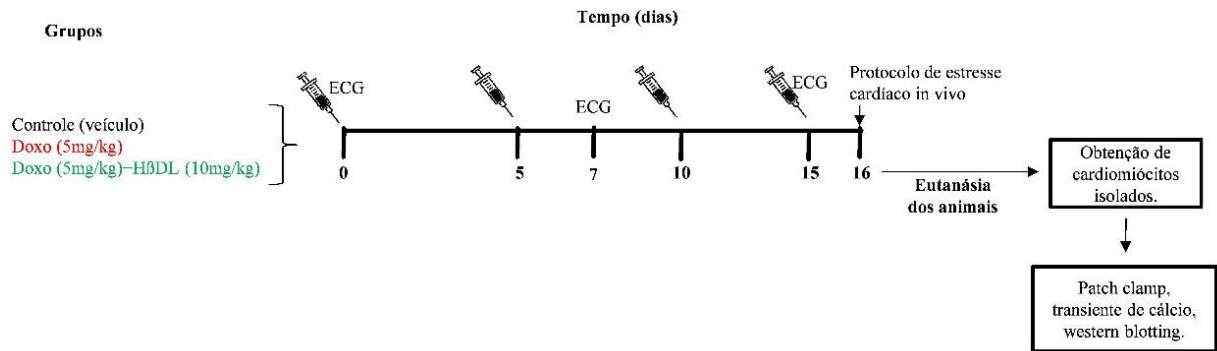


Figura 10. Delineamento experimental. Grupos, tratamentos e experimentos que visavam responder à pergunta de pesquisa. Fonte: Durço, A. O., 2023.

4.3 Análise comportamental para a avaliação de dor

Foi realizada avaliação quantitativa comportamental para avaliação de dor através da *Mouse Grimace Scale* (MGS). A escala foi aplicada nos dias de tratamento (dias 0, 5, 10 e 15), sendo sua aplicação realizada através da observação de parâmetros faciais (cerramento palpebral, focinho e bochechas achatadas, posição das orelhas e das vibrissas) e então atribuídos escores pré-definidos. A média resultante foi utilizada para indicar a presença/nível da dor: animais com média abaixo de 1 (dor leve) seguiram no estudo; contudo, foram reavaliados diariamente, animais com média entre 1 e 2 (dor moderada a intensa) seriam eutanasiados (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2006). Também foi realizada, diariamente, análise qualitativa comportamental para avaliação de dor, através da observação do aumento do tempo de sono; perda de peso/desidratação; piloereção e postura encurvada; isolamento do resto do grupo e se os animais gritavam ao serem tocados (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2006). Ao ser identificada alteração comportamental qualitativa, a escala MGS era aplicada independentemente do dia. Não houve eutanásia decorrente de alteração comportamental/dor, sendo a taxa de mortalidade desse estudo de 0%.

4.4 Mensuração das enzimas cardíacas

Para as medidas das enzimas envolvidas na lesão cardíaca foram avaliadas a lactato desidrogenase (LDH) e a creatina kinase fração MB (CK-MB). Para a obtenção do soro, o sangue do animal (~300uL), obtido por decaptação, foi

centrifugado a 4.500 rpm durante 10 min, as dosagens foram realizadas em triplicata de acordo com a bula do fabricante do kit de imunoensaio enzimático (Labtest Diagnóstica S.A.). Os testes foram realizados através do espectrofotômetro Labmax 240 Premium (Labtest, MG, Brasil).

4.5 Peso Corporal

A aferição do peso dos animais foi realizada com o auxílio de uma balança digital (Shimadzu UW6200H), devidamente calibrada em superfície nivelada. A medição procedeu-se com o auxílio de uma caixa transparente de acrílico, a balança foi zerada, os animais colocados na caixa e então o peso registrado. Tal procedimento fora realizado nos dias 0, 5, 10 e 15 do tratamento.

4.6 Análises histopatológicas

Após os procedimentos experimentais, os camundongos foram decapitados, os corações rapidamente removidos, lavados em KCl (1 Molar), cuidadosamente limpos e então fixados em formalina (10%) tamponada, pH 7,0-7,2, contendo fosfato de sódio monobásico anidro (4 g/L) e fosfato de sódio dibásico anidro (6,5 g/L) e após 72hs foram embebidos em parafina e cortados a 5 µm de espessura, sendo posteriormente corados com hematoxilina-eosina para avaliação de infiltrado celular inflamatório (DURÇO *et al.*, 2019).

4.7 Medições *in vivo* de ECG e suscetibilidade a arritmias *in vivo*

Medições de ECG de superfície foram realizadas nos dias 0, 7 e 15 após o começo do tratamento. Os camundongos foram anestesiados (isoflurano 5% para indução e 2% para manutenção), colocados em posição dorsal, gel eletrocardiográfico foi colocado na altura dos membros superiores e inferiores e então eletrodos de clipe tipo jacaré foram fixados e conectados a um módulo de aquisição de ECG, permitindo a visualização de três derivações bipolares. As gravações foram feitas em DII, por 5 min, em 1.2 kHz. O programa LabChart 8 foi utilizado para a análise do ECG.

A avaliação da suscetibilidade à arritmia foi realizada no 16º dia. Os animais foram preparados para a realização de ECG, como descrito anteriormente, e após 5 min de estabilização do sinal de ECG, a arritmia foi induzida unicamente através da administração de dobutamina (1 mg/kg, i.p.) - o protocolo foi adaptado e excluiu a cafeína, pois os animais do grupo Doxo eram mais sensíveis (como demonstrado na seção Resultados), havendo mortalidade neste grupo. Os sinais de ECG foram registrados por 10 minutos antes e depois da aplicação da dobutamina (FERNANDEZ-RUOCCO *et al.*, 2019; MALAGUETA-VIEIRA *et al.*, 2022; MONNERAT *et al.*, 2016). A porcentagem de animais com arritmia foi definida conforme o número de animais que apresentou extra-sístole (uma batida ventricular isolada), taquicardia ventricular (taquicardia ventricular de ≥ 3 complexos consecutivos originados nos ventrículos) e ou dissociação atrioventricular (uma batida comandando os átrios - geralmente sinusal, e a outra de origem ventricular independente) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2022). Cada animal com qualquer arritmia foi contado como um.

4.8 Obtenção de cardiomiócitos

Para a aquisição de cardiomiócitos isolados, após a eutanásia dos animais os corações foram cuidadosamente removidos, canulados através da aorta e então montados num sistema de Langendorff com pressão constante. Uma vez montados, foram perfundidos com soluções e enzimas a fim de realizar a digestão do tecido, conforme previamente descrito por Shioya (2007), na seguinte sequência: perfusão com solução livre de Ca^{2+} (CIB) (em mM: 130 NaCl, 5,4 KCl, 0,5 MgCl_2 , 0,33 NaH_2PO_4 , 22 glucose, 25 HEPES, e 0,4 EGTA - pH 7,4), mantido a 37°C durante 3 min para a completa remoção de sangue; substituição da solução por CIB contendo CaCl_2 (0,3 mM), collagenase tipo II (1 mg/mL), protease tipo XXIII (0,06 mg/mL), e tripsina (0,06 mg/mL). Passados 6 minutos de perfusão, os corações foram removidos da cânula, os átrios e ventrículos foram separados, os ventrículos esquerdos foram selecionados e o epicárdio removido mecanicamente. Os endocárdios foram cortados em pedaços pequenos, submetidos a novo processo de digestão por 9 min (37°C) com CIB suplementado com collagenase, tripsina, protease e CaCl_2 a 0,7 mM. As células foram isoladas do tecido por meio de agitação mecânica leve com pipeta de transferência. A solução resultante foi filtrada, centrifugada a 1000 rpm por 30 s, ressuspendida e mantida em solução CIB

contendo CaCl_2 (1,2 mM) e albumina bovina sérica (BSA, 2 mg/mL), por 10 min a 37°C . Por último, as células foram centrifugadas novamente (1000 rpm por 30 s) e mantidas em solução de Tyrode (em mM: 140 NaCl, 5,4 KCl, 0,5 MgCl_2 , 0,33 NaH_2PO_4 , 11 de Glicose, 5 HEPES e 1,8 CaCl_2 (pH 7,4), com utilização máxima de 4 hs após o término da dissociação (SHIOYA, 2007).

4.9 Potencial de ação e indução de arritmia *in vitro*

Cardiomiócitos isolados do endocárdio do ventrículo esquerdo foram utilizados para registrar o potencial de ação (PA). A solução de Tyrode foi utilizada como solução externa; e como solução interna inserida nas micropipetas (em mM): 130 K-aspartato, 13 KCl, 10 HEPES, 1 MgCl_2 , 5 NaCl, 5 Na_2ATP , pH 7,2 ajustado com KOH – pipetas com resistência de 1,5-2,5 M Ω . Células com resistência em série maior que 8 M Ω não foram consideradas para análise. Os PAs foram forçados por um pulso quadrado de 3-5 ms, 1 nA. O sistema de registro de corrente *whole cell* foi usado, obtido por meio de um amplificador de *patch clamp* EPC-10 (HEKA, Holliston, Massachusetts, EUA), numa frequência de aquisição de 10 kHz, com o experimento realizado em temperatura ambiente ($23 - 26^\circ\text{C}$). O protocolo do experimento pode ser visto na Figura 11.

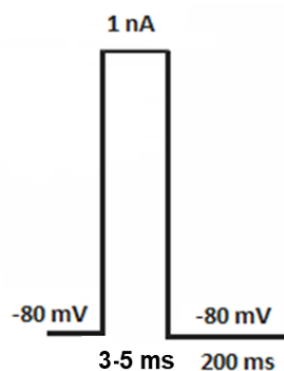


Figura 11. Protocolo de estimulação para evocar o potencial de ação. Fonte: Souza, 2019.

Para a indução da arritmia *in vitro*, os cardiomiócitos foram submetidos a um protocolo de estimulação em “burst”, que pode ser visto na Figura 12. Utilizou-se uma frequência de 5 Hz por 100 pulsos, cada pulso quadrado com duração de 3 ms. Uma pausa de 500 ms foi aplicada, seguida de mais um pulso quadrado e pausa de

10 segundos para observação de eventos espontâneos de arritmias. A análise foi realizada célula a célula, sendo utilizado um escore para eventos pró-arrítmicos, a saber: pós-despolarização (DAD) - pontuação 1; *triggered* - pontuação 2 (IYER *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2022); a dispersão do PA foi medida considerando o desvio padrão (DP) do PA. Os experimentos foram realizados usando a técnica *patch-clamp* no modelo *whole cell*. As gravações do PA foram realizadas a 10 kHz.

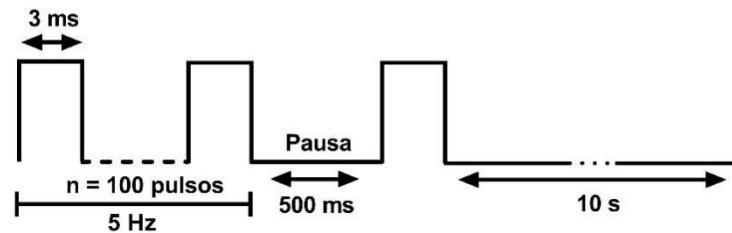


Figura 12. Protocolo de estimulação em “burst”. Fonte: Souza, 2022.

4.10 Transiente de cálcio

Os cardiomiócitos foram incubados com solução de Tyrode e Fluo-4AM 5 μM , em temperatura ambiente, por 30 min, foram estabilizados com uma frequência de estimulação elétrica de 1 Hz por 60 segundos, depois os transientes intracelulares de Ca^{2+} e ondas de Ca^{2+} foram forçados e avaliados numa frequência de estimulação elétrica fixadas em 5 Hz (100 pulsos), seguido de uma pausa de 10 segundos para observação de transientes espontâneos (SOUZA *et al.*, 2022). A imagem de varredura foi adquirida por um microscópio confocal LSM 880 (Carl Zeiss, Alemanha), óleo 63x, numa frequência de aquisição de 10 kHz. O Fluo-4AM foi excitado por um laser de argônio de 488 nm e a intensidade da emissão medida em >510 nm. O *software* ImageJ (*software* gratuito ImageJ empacotado com Java 1.8.0_112 64 bits, NIH, EUA) (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012) foi usado para a análise do transiente de Ca^{2+} .

4.11 Avaliação da $I_{\text{Ca,L}}$

Registros na configuração *whole-cell voltage-clamp* foram obtidos usando um amplificador de *patch-clamp* EPC-10 USB (HEKA Electronics, Rheinland-Pfalz, Alemanha), numa frequência de aquisição de 10 kHz. Os cardiomiócitos com resistência em série (R_s) acima de 8 M Ω foram descartados. As pipetas de registro

apresentavam resistências na ponta de 2-3 M Ω . Foi usado o seguinte protocolo de pulsos para avaliar a $I_{Ca,L}$: a voltagem da membrana foi mantida em -80 mV “*holding*”, foi aplicado um pré-pulso de -40 mV por 50 ms, a fim de inativar os canais rápidos de sódio e canais para Ca^{2+} tipo T. Logo em seguida, foi aplicado um pulso-teste, despolarizando a membrana para 0 mV (300 ms), retornando em seguida ao potencial “*holding*” original, a cada 10 s. O protocolo utilizado pode ser visto na Figura 13. A composição da solução interna foi (em mM): 120 CsCl, 20 TEACl, 5 NaCl, 10 HEPES e 10 EGTA, 1 MgCl₂, o pH foi ajustado para 7,2 usando CsOH e a solução externa foi (em mM): 150 TEACl, 0,5 MgCl₂, 1,8 CaCl₂, 10 HEPES e 11 glucose, pH 7,4 ajustado com TEA (OH).

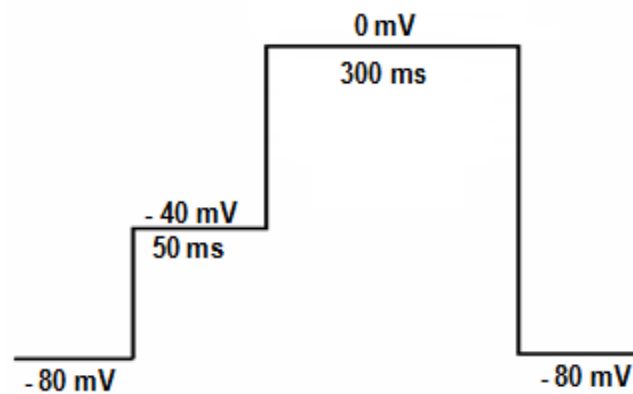


Figura 13. Protocolo da $I_{Ca,L}$. Fonte: Souza, 2019.

4.12 Encurtamento Sarcomérico

Para a avaliação do encurtamento sarcomérico, a visualização das células aconteceu através de um microscópio invertido (Motic AE31, China). A estimulação dos cardiomiócitos deu-se com o auxílio de um estimulador de campo (Myopacer, IonOptix, Milton, MA, EUA), através de pulsos de 8 ms de duração e 12 V de amplitude, numa frequência de aquisição de 800 Hz. Os cardiomiócitos foram estimulados na frequência de 1 Hz por 1 min, sendo as células fotografadas por uma câmera NTSC (MyoCamCCD100V, IonOptix, EUA). Foram avaliadas de 10 a 20 contrações, sendo nestas analisadas o tempo para atingir 50% da contração máxima do sarcômero (T50C); tempo para atingir 50% do relaxamento do sarcômero (T50R) a partir do pico de contração e sua amplitude.

4.13 Expressão de proteínas pela técnica de Western Blot

A expressão das proteínas das vias apoptótica e antiapoptótica Bax, caspase 3 e Bcl-2, como também da CaMKII foram analisadas quanto a densidade de expressão. Os tecidos cardíacos foram homogeneizados em tampão de lise gelado (em mM: 100 NaCl, 50 trisbase, 5 EDTA.2 H₂O e 1 MgCl₂, pH 8,0) sendo 0,3% de triton X100, 1% de nonidet P40, 0,5% de desoxicolato de sódio, 20 mM NaF com protease (# P8340, Sigma-Aldrich), coquetéis inibidores da fosfatase (# P0044, Sigma-Aldrich) e ditiotretol (DTT, 1 mM) e as proteínas do sobrenadante foram quantificadas pelo método Lowry (LOWRY *et al.*, 1951). Quantidade equivalente de proteína em gel de poliacrilamida com DPS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*), de 10% ou 15%, foi transferida para membrana de PVDF (Thermofisher®, USA), sendo bloqueados à temperatura ambiente com solução de BSA a 4% e incubados com os anticorpos primários (anti-CaMKII 1:500, #sc-5306, Santa Cruz Biotechnology; anti-pCaMKII-Thr286 1:500, #D21E4, Cell Signaling; anti-CAMKII oxidized Met 281/282 1:500, #07-1387, Millipore; anti-Bax 1:500, #sc-7480, Santa Cruz Biotechnology; anti-Caspase 3 1:500, #sc-7272, Santa Cruz Biotechnology; anti-Bcl-2 1:500, #sc-7382, Santa Cruz Biotechnology; anti- β actina 1:100, #5500001, Sigma-Aldrich; anti-GAPDH 1:1000, #sc-32233, Santa Cruz Biotechnology) por 12 h.

Após incubação em anticorpos primários, a membrana foi submetida à tripla lavagem com TBS-T (tris-buffered saline Tween 20) por 5 minutos e incubada por 2 h com anticorpos secundários (1:15000, Goat anti-Rabbit IgG (H+L), DyLight™ 800 4X PEG # SA5-35571 Invitrogen; 1:20000, Goat anti-Mouse IgG (H+L), DyLight™ 800 4X PEG # SA5-35521 Invitrogen) diluídos em TBS-T. O complexo imune foi revelado por detecção com equipamento Odyssey Li-Cor (Li-Cor, Lincoln, NE, USA). O *software* ImageJ foi utilizado para análise densitométrica e os resultados foram obtidos através da razão entre as densidades óticas das proteínas de interesse e os respectivos controles de *load*.

4.14 Mensuração de EROs citoplasmática e mitocondrial

Os cardiomiócitos foram incubados com corantes específicos para EROs – superóxido (DHE 10 μ M, Invitrogen #D11347 Molecular Probes Inc., Ontario, USA) a 37°C por 30 min, em seguida as células foram lavadas com solução de Tyrode

contendo 1,8 mM Ca^{2+} para remover o excesso de sonda. A detecção foi realizada por microscopia confocal com tempo de exposição fixo para todos os grupos. As intensidades de fluorescência foram determinadas usando ImageJ 1.38x *software* (NIH, USA). Experimentos controle foram realizados com apocinina (1 μM , Sigma #PHL83252). Para detecção da produção mitocondrial de EROs, utilizou-se a sonda MitoSOX red (5 μM) e para a massa mitocondrial MitoTracker green (200 nM) (Invitrogen #M36008 e M7514, Molecular Probes Inc., Ontario, USA), sendo o experimento controle realizado com MitoTempo (25 μM , Cayman #16621). As células foram analisadas em um sistema confocal LSM 510 META (Zeiss, Jena, Alemanha) (RHANA *et al.*, 2022).

4.15 Mensuração da lipoperoxidação e atividade enzimática da catalase, superóxido dismutase e glutathiona peroxidase

Para a avaliação da lipoperoxidação utilizou-se o TBARS Kit de ensaio (Cayman Chemical #10009055), para as atividades enzimáticas da catalase e glutathiona peroxidase foram utilizados, respectivamente, Catalase Kit de ensaio (Cayman Chemical #707002), Superoxide Dismutase Kit de ensaio (Cayman Chemical #706002) e Glutathione Peroxidase Kit de ensaio (Cayman Chemical #703102), todos em homogenato de tecido, seguindo as orientações do fabricante. Os testes foram realizados através do espectrofotômetro Labmax 240 Premium (Labtest, MG, Brasil).

4.16 Docking Molecular

Análises de docking molecular foram empregadas para investigar a interação entre DL e dois alvos potenciais. Neste estudo, os alvos usados foram o membro 4 da família da quinase de cadeia leve de miosina (Myk4) e a proteína quinase II dependente de cálcio/calmodulina (CaMKII) de camundongos. As estruturas tridimensionais dessas proteínas foram obtidas da Uniprot (uniprot.org) (Acesso: Q5SUV5) e Protein Data Bank (rcsb.org) (PDB ID: 1hxx), respectivamente (Hoelz *et al.*, 2003). A estrutura DL foi obtida da Pubchem (CID: 440917) (Kim *et al.*, 2021). Além disso, a estrutura da droga Fostamatinibe (Drugbank ID: DB12010), relatada

como um inibidor dos alvos investigados, foi usada como controle (Wishart et al., 2017; Rolf et al., 2015).

Proteínas e ligantes foram preparados usando ferramentas Autodock e Open babel (O'Boyle et al., 2011; Morris et al., 2010). Nesta etapa, os heteroátomos foram removidos, os hidrogênios polares foram adicionados e a minimização da energia do ligante foi realizada. Para os cálculos de Docking molecular, foi utilizado o algoritmo Autodock Vina (Trott e Olson, 2010). O volume da grade foi configurado para abranger toda a estrutura da Mylk4. Para o alvo CaMKII, devido ao seu tamanho, foi definida uma grade capaz de englobar 4 dos 14 protômeros que formam sua estrutura. Os demais parâmetros de análise foram mantidos como padrão. Após o processo de docking, o *software* Discovery Studio v16 foi usado para visualizar e comparar as interações entre os dois ligantes e alvos (BIOVIA).

4.17 Análise estatística

Os dados foram tabulados em MS Excel e os gráficos e análise realizadas com o GraphPad Prism™ (San Diego, CA, USA). Todos os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP), e o número de animais e células foi mostrado como n. A normalidade e a igualdade de variância foram verificadas pelo teste de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Para a decisão estatística, utilizou-se o teste ANOVA one-way ou two-way, conforme cada caso, ou teste qui-quadrado, seguidos do teste de Bonferroni. Valores de probabilidade de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 Resultados

5.1 Efeitos do DL e H β DL sobre os biomarcadores séricos de lesão cardíaca e peso corporal de animais tratados com Doxo

Inicialmente, avaliou-se os biomarcadores séricos de cardiotoxicidade, CK-MB e LDH, como forma de estimar os efeitos tóxicos da Doxo e os efeitos do tratamento com DL e H β DL sobre esta cardiotoxicidade – considerando a melhor dose da formulação para evitar o uso de grande quantidade de animais. Foi observado que os níveis séricos de ambos os biomarcadores foram significativamente maiores no grupo Doxo ($9,40 \pm 0,73$ e $343,3 \pm 129,9$ U/L, respectivamente), quando comparado ao grupo controle ($5,86 \pm 0,61$ e $103,1 \pm 18,76$ U/L, $p = 0,01$), sendo ambos reduzidos tanto pelo DL quanto pelo H β DL (Fig. 14 A e B). Como não houve diferença no efeito sobre os biomarcadores entre as doses testadas de H β DL, para os experimentos seguintes foi utilizada a menor dose de H β DL (10 mg/kg). A H β CD sozinha não alterou os parâmetros avaliados.

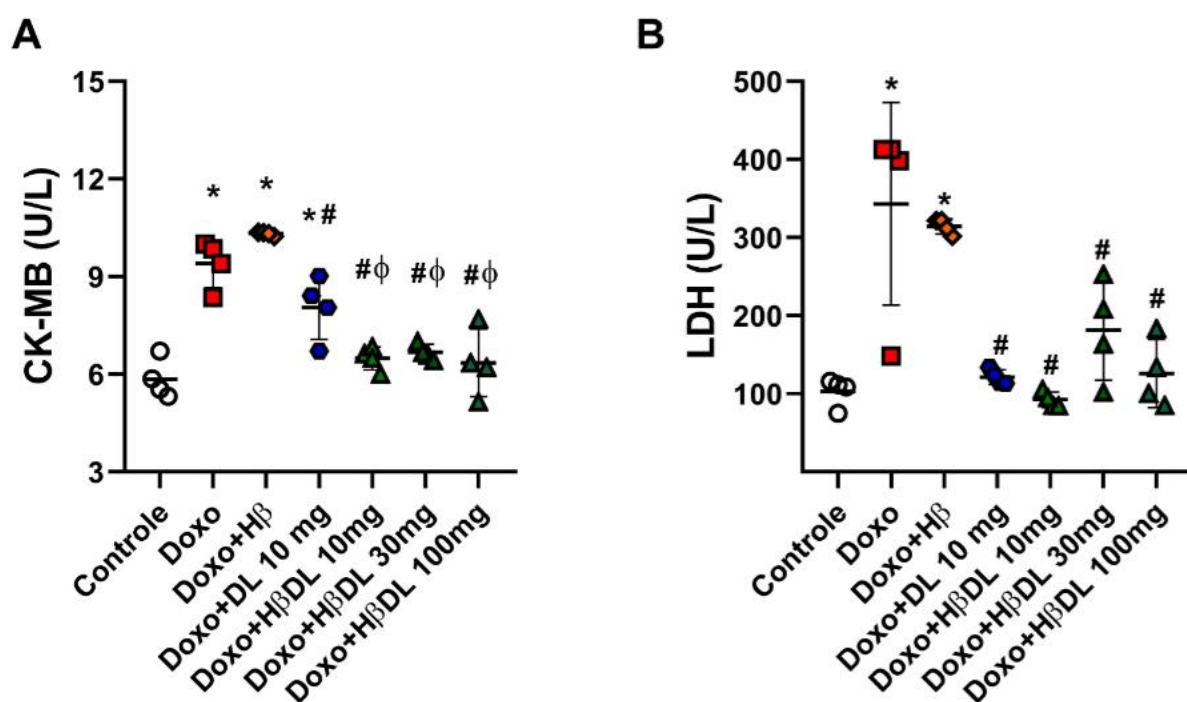


Figura 14. Efeito do D-limomeno (DL) e do complexo de inclusão H β DL sobre a cardiotoxicidade induzida por Doxorubicina (Doxo). A - isotipo MB da isoenzima creatina quinase (CK-MB) e B - lactato desidrogenase (LDH). Os resultados são representados como média $\pm$ DP (n = 4/grupo). *p < 0,05 Doxo vs Controle; #p <

0,05 Doxo + H β DL vs Doxo; $\Phi p < 0,05$ H β DL vs DL. ANOVA de uma via seguida pós-teste de Bonferroni.

O peso corporal foi medido antes de cada administração de Doxo ou veículo e, quando comparado ao controle, o grupo Doxo permaneceu sem ganho de peso durante todo o tratamento (Fig. 15). O grupo Doxo + H β DL 10 mg/kg apresentou ganho de peso semelhante ao grupo controle que, quando comparado ao grupo Doxo foi significativamente maior após o dia 10.

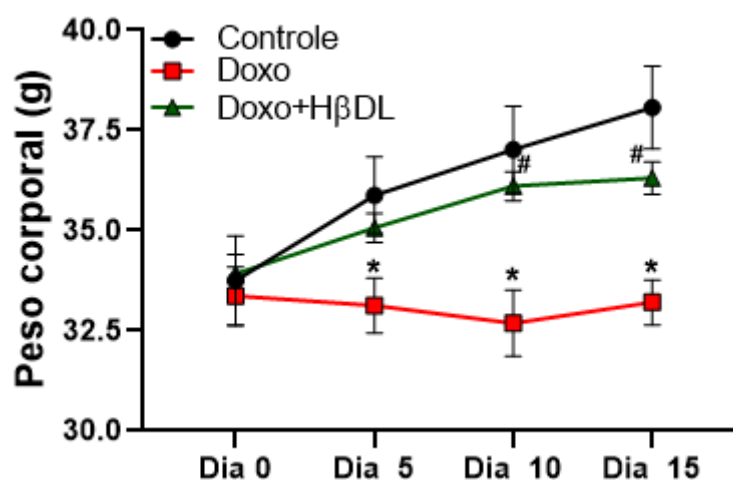


Figura 15. Efeito do complexo de inclusão H β DL 10 mg sobre o peso dos animais durante a cardiotoxicidade induzida por Doxorubicina (Doxo). Os dados são representados como médias $\pm$ DP (n = 11-17). * $p < 0,05$ Doxo vs Controle; # Doxo + H β DL 10 mg/kg vs Doxo. ANOVA de uma via seguida pós-teste de Bonferroni.

5.2 H β DL previne alterações histológicas causadas pela Doxo

As imagens histológicas podem ser vistas na Figura 16 A-C. Percebe-se a presença, no grupo Doxo, da fragmentação de miofibrilas, edema, vacuolização e presença de infiltrado inflamatório. A administração de H β DL preveniu esses achados histopatológicos, com manutenção do padrão normal das fibras cardíacas, diminuição do edema intersticial e vacuolização, como também do infiltrado celular (Figura 16 D, E). No grupo controle (Figura 16 A) observa-se ausência de lesões microscópicas perceptíveis e manutenção de padrões de normalidade como a

arquitetura das fibras do miocárdio, cardiomiócitos com núcleos centrais, ausência de edema e células inflamatórias.

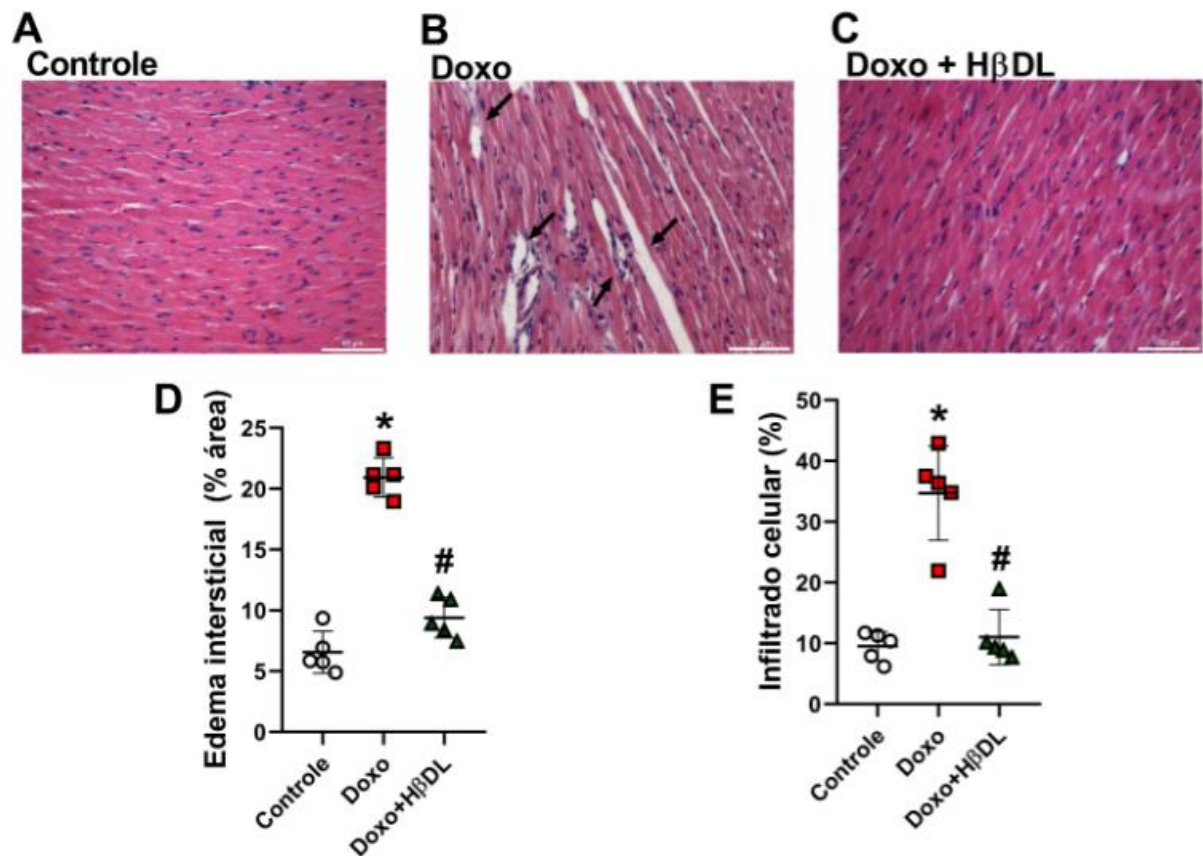


Figura 16. Efeito do complexo de inclusão H β DL 10 mg reverte alterações histológicas no miocárdio causadas pela cardiotoxicidade induzidas por **Doxorrubicina (Doxo)**. Ventricúlos esquerdos de: A - controle; B - Doxo, setas indicam infiltrado celular, vacúolos e edema; C – Doxo + H β DL. D - edema intersticial. E - infiltrado celular. Resultados apresentados como média $\pm$ DP (n=5/grupo). *p<0,05 Doxo vs Controle; #p<0,05 Doxo + H β DL versus Doxo. ANOVA unidirecional seguida de pós-teste de Bonferroni.

5.3 Alterações eletrocardiográficas causadas pela Doxo são prevenidas por H β DL

O ECG é um dos métodos mais importantes para avaliar a função cardíaca *in vivo*, e alterações no ECG são comumente observadas durante o tratamento com Doxo (van Acker et al., 1996). Assim, realizou-se experimentos de ECG durante o tratamento em 3 momentos diferentes (0, 7 e 15 dias durante a indução). Os

parâmetros de ECG são mostrados na Tabela 2. Na referida tabela, observa-se no grupo Doxo um aumento na duração do complexo QRS e intervalo QTc no dia 15, bem como um aumento na frequência cardíaca (dias 7 e 15). No grupo de animais com administração simultânea de Doxo + H β DL todas essas alterações foram prevenidas. Não foram observadas alterações no PRi entre os distintos grupos.

Tabela 1. Parâmetros do eletrocardiograma no Controle, Doxorrubicina (Doxo) e Doxo + complexo de inclusão H β DL 10mg/kg.

	Controle	Doxo	Doxo + H β DL
PR (ms)			
Dia 0	41,25 $\pm$ 1,50	39,25 $\pm$ 4,92	38,25 $\pm$ 3,86
Dia 7	39,75 $\pm$ 3,86	37 $\pm$ 7,07	35,5 $\pm$ 10
Dia 15	42 $\pm$ 4,32	43,25 $\pm$ 6,18	39 $\pm$ 3,36
QRS (ms)			
Dia 0	20 $\pm$ 2,828	20 $\pm$ 1,633	17 $\pm$ 3,606
Dia 7	20,5 $\pm$ 4,20	19,25 $\pm$ 2,63	18,75 $\pm$ 5,05
Dia 15	21,75 $\pm$ 1,25	31,5 $\pm$ 2,38*,&	21 $\pm$ 1,15 [#]
QTc (ms)			
Dia 0	211,5 $\pm$ 26,56	204,5 $\pm$ 5,50	189 $\pm$ 11,28
Dia 7	186,9 $\pm$ 27,30	183,7 $\pm$ 13,51	182,1 $\pm$ 31,65
Dia 15	185,4 $\pm$ 6,12	241,8 $\pm$ 21,39*,&	172,3 $\pm$ 28,72 [#]
BPM			
Dia 0	474,1 $\pm$ 20,93	459,7 $\pm$ 27,4	471,6 $\pm$ 55,69
Dia 7	460,6 $\pm$ 22,56	557,6 $\pm$ 61,04*,&	481 $\pm$ 108,80 [#]
Dia 15	478,2 $\pm$ 7,345	570 $\pm$ 34,46*,&	490,2 $\pm$ 29,57 [#]

Os dados são representados como médias $\pm$ DP. (n = 6). * p < 0,05 Doxo vs Controle; & p < 0,05 Doxo dia 07 ou 15 vs Doxo dia 0; #p < 0,05 Doxo + H β DL 10 mg/kg vs Doxo. Anova unidirecional seguida do pós-teste de Bonferroni.

Fora também realizado um protocolo de estresse cardíaco *in vivo* com dobutamina. Como pode ser visto nas Figuras 17 A e B, após a administração de dobutamina, a frequência cardíaca nos grupos controle e Doxo + H β DL aumentou

cerca de 20%, enquanto no grupo Doxo aumentou apenas 9%. Além disso, como mostrado na Figura 17 A e C, as arritmias do grupo Doxo foram 50% maiores após a administração de dobutamina do que nos animais do grupo Doxo + H β DL.

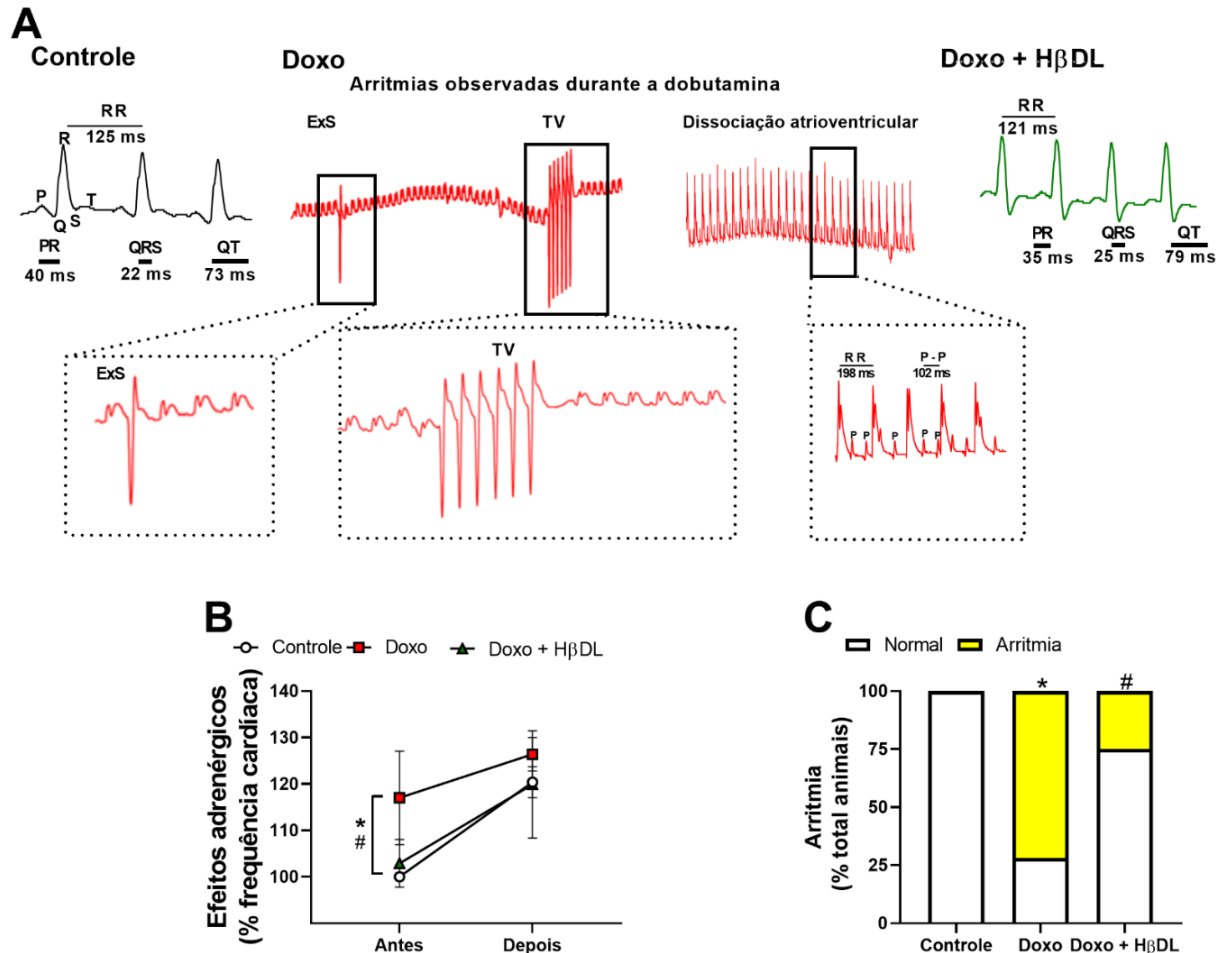


Figura 17. Complexo de inclusão H β DL 10 mg/kg previne arritmia na cardiotoxicidade induzida por Doxorubicina (Doxo). A -traços representativos de ECG (esquerda) no controle (preto), Doxo (vermelho) e Doxo + H β DL 10 mg/kg (verde), à direita traços representativos de arritmia: extrassístoles (ExS), taquicardia ventricular (TV) e bloqueio atrioventricular (bloqueio AV); B - percentual da frequência cardíaca normalizada pela média do controle (antes da dobutamina), antes e depois da estimulação com dobutamina; C - ocorrência de arritmia após estimulação com Dobutamina; D - estratificação das arritmias. Os resultados são representados como média $\pm$ DP (n = 7/grupo). *p < 0,05 Doxo vs Controle; #p < 0,05 Doxo + H β DL 10 mg/kg vs Doxo. ANOVA de uma via seguida pós-teste de Bonferroni. Teste do χ^2 em C.

Ao serem estratificadas (Fig. 18), as arritmias apresentadas foram: extrassístoles (ExS), taquicardia ventricular (TV) e dissociação atrioventricular. Importante salientar que tais tipos de arritmia são incidentes também na clínica (QIU; JIANG; HUANG, 2023), e que o H β DL foi capaz não apenas de reduzir a incidência das arritmias – como a TV que passou de 21% para 11% e a extrassístole de 28% para 22%, mas também de abolir a arritmia de maior incidência, a dissociação AV.

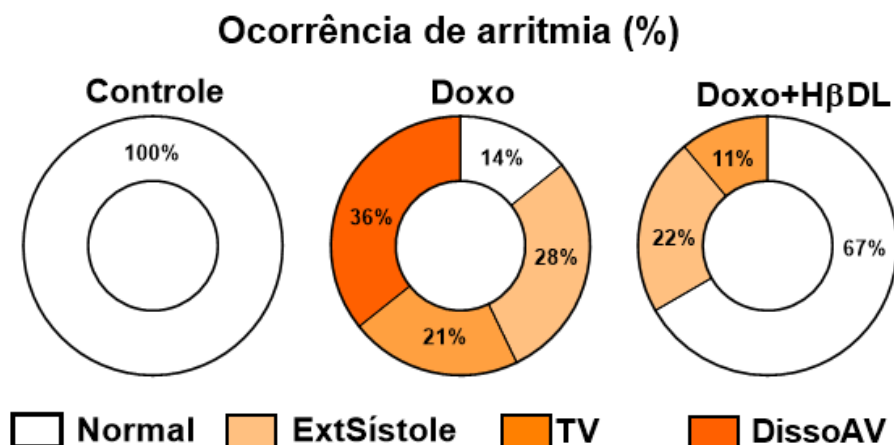


Figura 18. Complexo de inclusão H β DL 10 mg/kg reduz a severidade da arritmia na cardiotoxicidade induzida por Doxorrubicina (Doxo). Estratificação das arritmias no controle, Doxo e Doxo + H β DL 10 mg/kg. ExtSístole: extrassístole; TV: taquicardia ventricular; DissoAV: dissociação atrioventricular. Os resultados são representados como a porcentagem da ocorrência de arritmias por animais ($n = 7/\text{grupo}$).

5.4 H β DL previne alterações no PA na cardiotoxicidade induzida por Doxo

Considerando as alterações eletrocardiográficas apresentadas e como o H β DL foi capaz de prevenir o fenótipo induzido pela Doxo, foi estudado o potencial de ação cardíaco (PA) ventricular utilizando cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo. Como pode ser observado nas figuras 19 A, B e C, não houve diferença na amplitude do PA e na inclinação máxima da fase 0 (dV/dT). Por outro lado, a duração do PA em 50% e 90% foram aumentadas no grupo Doxo (50% de $5,00 \pm 2,38$ ms para $7,44 \pm 1,78$ ms e em 90% de $30,61 \pm 7,38$ ms para $52,17 \pm 19,64$ ms) e este aumento foi prevenido por H β DL.

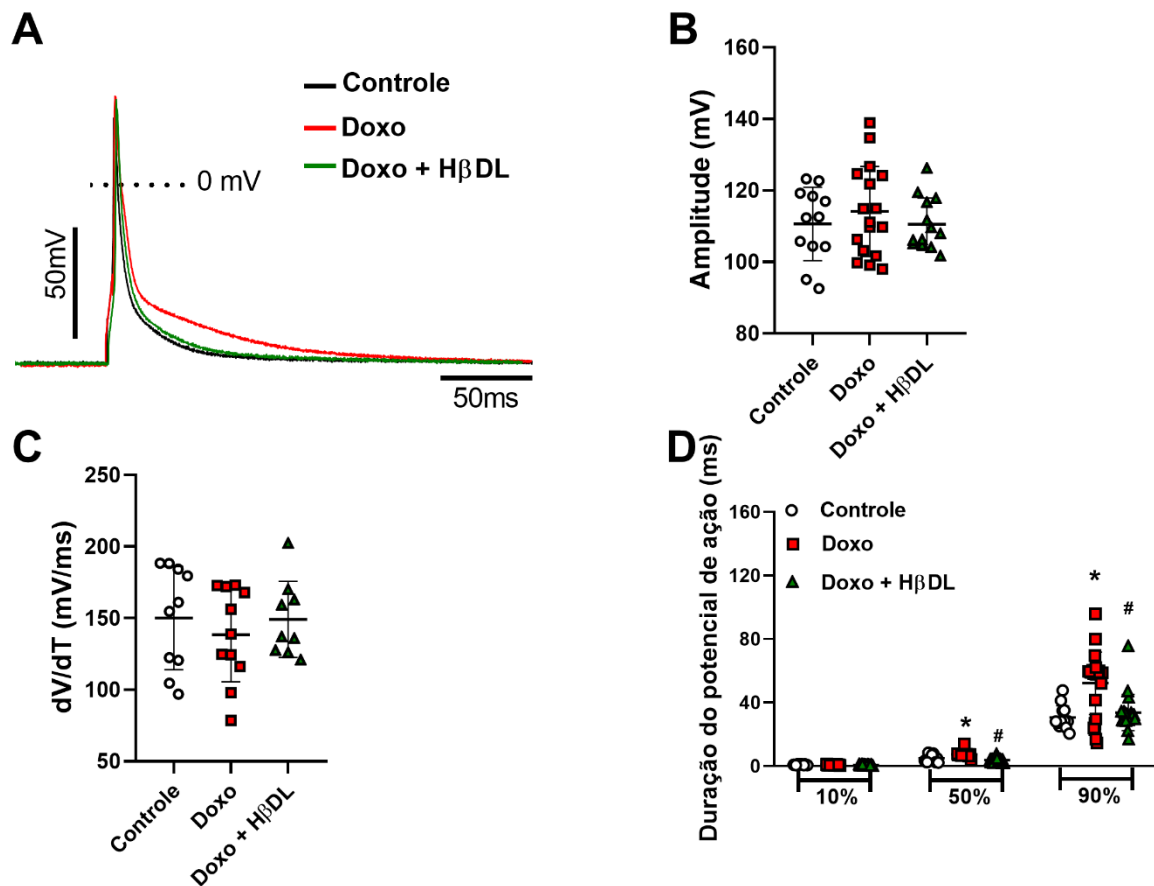


Figura 19. Complexo de inclusão HβDL 10 mg/kg previne a remodelação do potencial de ação (PA) na cardiotoxicidade induzida por Doxorubicina (Doxo). A - traços representativos do PA no controle (preto), Doxo (vermelho) e Doxo + HβDL 10 mg/kg (verde); B - amplitude do PA (mV); C - inclinação máxima da fase 0 (dV/dt - mV/ms); D, duração do PA (ms) em 10, 50 e 90% da repolarização. Os resultados são representados como média $\pm$ DP ($n = 6$ /grupo; célula = 20–25 células/grupo). * $p < 0,05$ Doxo vs Controle; # $p < 0,05$ Doxo + HβDL vs Doxo. ANOVA de uma via seguida pós-teste de Bonferroni.

Ademais, a dispersão da duração do PA entre PAs consecutivos (traços representativos exibidos na Figura 20 A), em 90%, foi consideravelmente maior no grupo Doxo do que nos grupos controle e Doxo + HβDL (Figura 20 B).

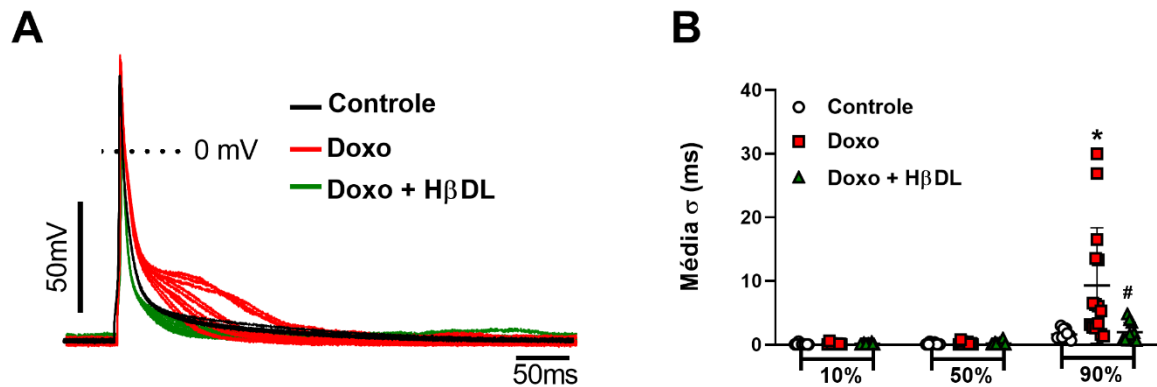


Figura 20. Complexo de inclusão HβDL 10 mg/kg previne a dispersão do potencial de ação (PA) na cardiotoxicidade induzida por Doxorubicina (Doxo). A - traços representativos do PA no controle (preto), Doxo (vermelho) e Doxo + HβDL 10 mg/kg (verde); B - desvio padrão médio (ms) em 10%, 50% e 90% da repolarização. Os resultados são representados como média $\pm$ DP (n = 6/grupo; célula = 20–25 células/grupo). *p < 0,05 Doxo vs Controle; #p < 0,05 Doxo + HβDL vs Doxo. ANOVA de uma via seguida pós-teste de Bonferroni.

5.5 HβDL impediu o aparecimento de arritmias de estimulação rápida (*burst pacing*) e reduziu as ondas de Ca^{2+} induzidas pela Doxo

O protocolo de estimulação em *burst* e os traçados do PA no controle (preto), Doxo (vermelho) e Doxo + HβDL (verde) podem ser vistos na Figura 21 A. As setas pretas indicam eventos pró-arrítmicos, como pós-despolarização retardada (DAD) e desencadeamento de PA espontâneo (*triggered*). Por meio de um escore pró-arrítmico, foi avaliado o percentual de células que apresentavam arritmia. Observou-se que o grupo Doxo apresentou um escore aumentado em relação ao grupo controle, e este aumento foi reduzido no grupo Doxo + HβDL (Figura 21 B). A Figura 21 C mostra a porcentagem de cada evento arrítmico, sendo evidenciado que 60% de tais eventos no grupo Doxo é composta de *triggered*, enquanto no grupo Doxo + HβDL, essas arritmias foram reduzidas para 36%; já em relação as DADs, essa incidência foi de 27% para 9%. Ao todo, 87% das células do grupo Doxo apresentaram arritmias, o que foi reduzido para 45% no grupo Doxo + HβDL.

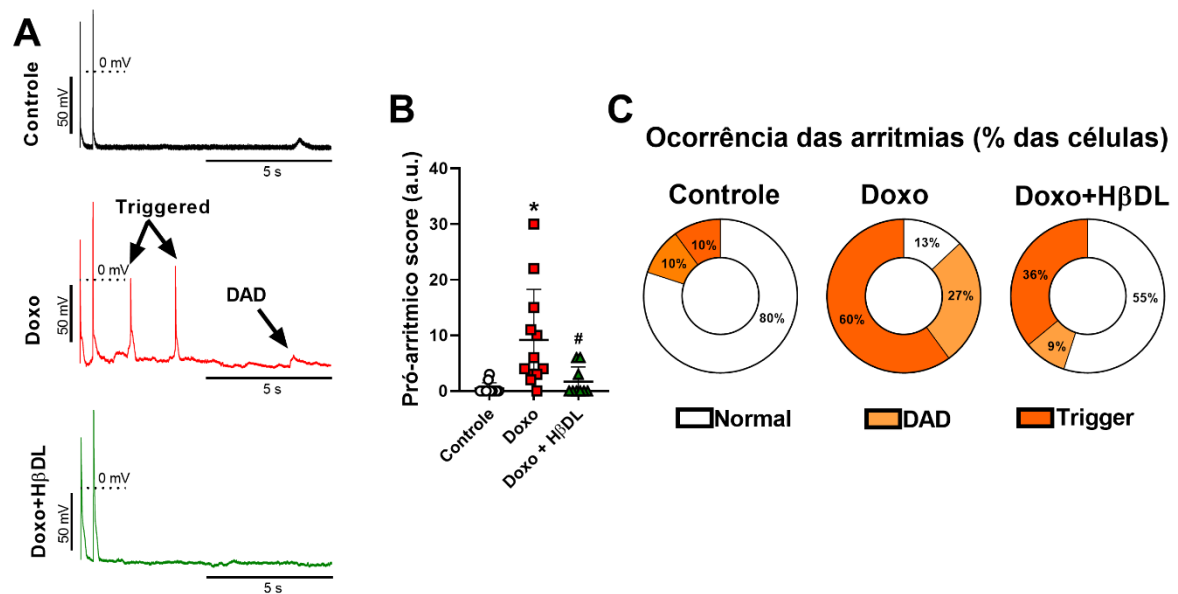


Figura 21. Complexo de inclusão HβDL 10 mg/kg previne pós-despolarização retardada (DAD) e desencadeamento de estimulações espontâneas (*triggered*) desencadeada pela cardiotoxicidade induzida por Doxorubicina (Doxo). A - traçados representativos do PA no controle (preto), Doxo (vermelho) (setas pretas indicam DAD e *triggered*) e Doxo + HβDL (verde); B - escore do potencial pró-arritmico; C - ocorrência de arritmias: DAD e *triggered*. Os resultados são representados como média ± DP (n = 6/grupo; célula = 25–40 células/grupo). *p < 0,05 Doxo vs Controle; #p < 0,05 Doxo + HβDL vs Doxo. ANOVA de uma via seguida pós-teste de Bonferroni.

O acoplamento excitação-contração em cardiomiócitos mantém estreita relação com o manuseio de Ca^{2+} , assim, avaliou-se, ainda em cardiomiócitos isolados, os transientes de Ca^{2+} em estimulação constante e também após o protocolo de estimulação em *burst*. A fluorescência transitória intracelular média representativa do Ca^{2+} e as imagens pseudocoloridas são apresentadas na Figura 22 A, estando em sua parte inferior os traçados representativos do transiente de Ca^{2+} nas situações de controle (preto), Doxo (vermelho) e Doxo + HβDL (verde). Percebe-se que a amplitude do transiente de Ca^{2+} está aumentada no grupo Doxo (aumento de 95,93% na fluorescência do transiente de Ca^{2+}), enquanto o tempo de decaimento deste mesmo grupo foi mais rápido (25,19%) (Figura 22 B e D). Não foi

observada diferença entre os grupos no tempo até o pico (Figura 22 C). Ainda, após o protocolo de estimulação em *burst*, o grupo Doxo apresentou maior número de ondas de Ca^{2+} (fora de estimulação) (Figura 22 E); interessante, o H β DL 10 mg/kg atenuou as alterações nos parâmetros avaliados (Figura 22 B, D e E).

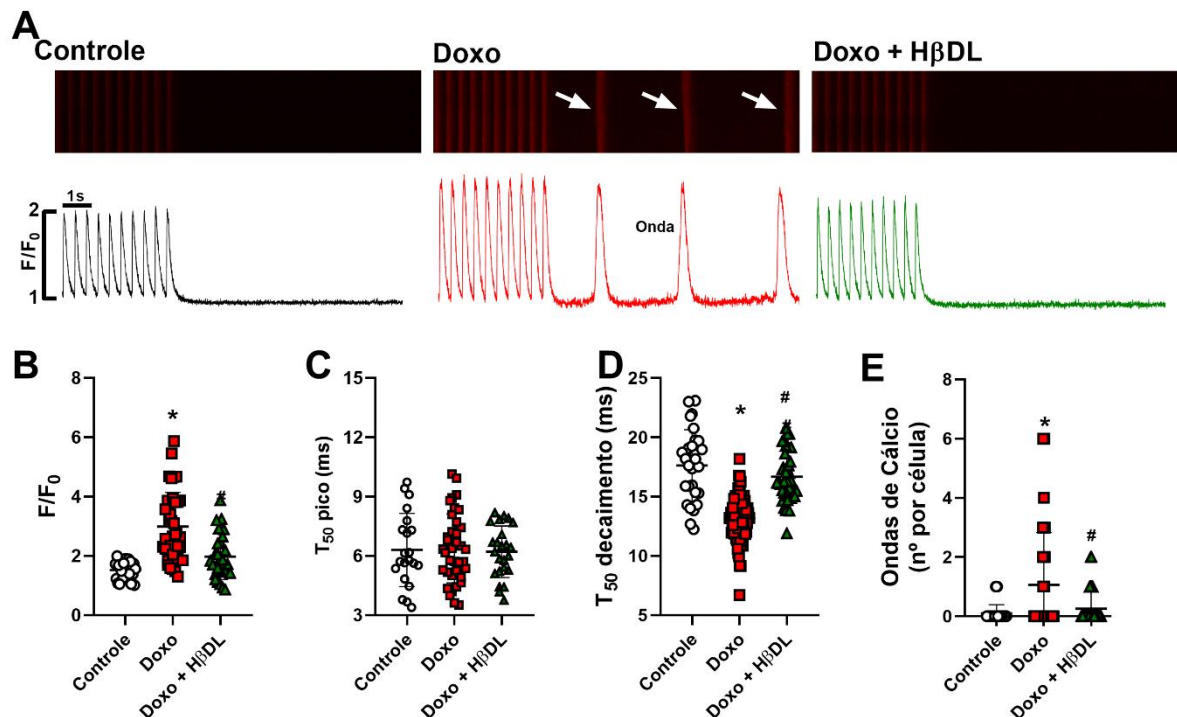


Figura 22. Complexo de inclusão H β DL 10 mg/kg previne aumento no transiente de Ca^{2+} e ondas de Ca^{2+} desencadeada pela cardiotoxicidade induzida por Doxorrubicina (Doxo). A - parte superior: imagens pseudocoloridas (a seta branca indica ondas de Ca^{2+} fora de estimulação), parte inferior: transientes intracelulares de Ca^{2+} representativos do controle (preto), Doxo (vermelho) e Doxo + H β DL (verde); B - amplitude do transiente de Ca^{2+} ; C - tempo em 50% para o pico do transiente de Ca^{2+} (ms); D, tempo em 50% para decaimento (ms) do transiente de Ca^{2+} ; E, ondas espontâneas de Ca^{2+} . Os resultados são representados como média $\pm$ DP (n = 6/grupo; célula = 25–40 células/grupo). *p < 0,05 Doxo vs Controle; #p < 0,05 Doxo + H β DL vs Doxo. ANOVA de uma via seguida pós-teste de Bonferroni.

5.6 H β DL impediu o aumento da corrente de Ca²⁺ do tipo L induzida pela Doxo

Observado o aumento do transiente de Ca²⁺ ocasionado pelo tratamento com Doxo, decidiu-se investigar a corrente de Ca²⁺ tipo L ($I_{Ca,L}$). A Figura 23 A mostra traçados representativos da $I_{Ca,L}$ nos grupos controle (preto), Doxo (vermelho) e Doxo + H β DL (verde). Como pode ser visto, houve aumento da $I_{Ca,L}$ de $-8,46 \pm 2,03$ para $-12,71 \pm 4,34$ nos animais tratados com Doxo, por outro lado, nos animais tratados com H β DL esse aumento na $I_{Ca,L}$ não foi observado (Figura 23 B).

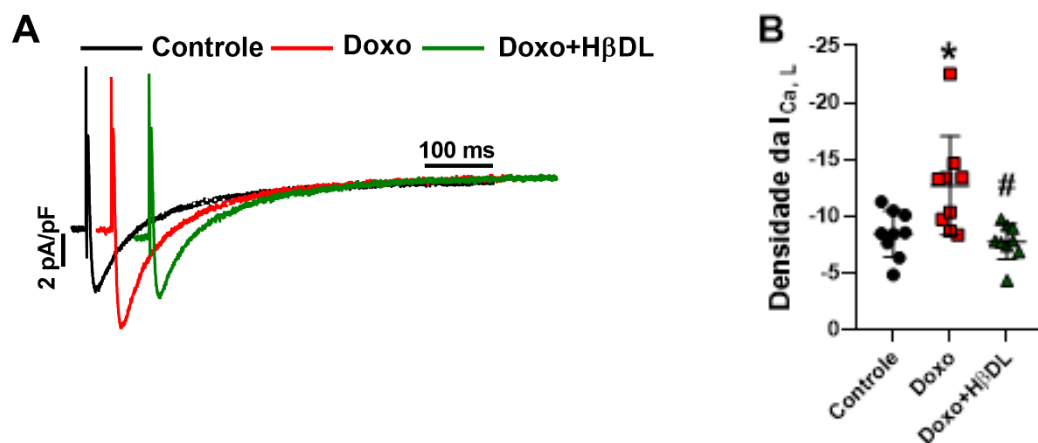


Figura 23. Complexo de inclusão H β DL 10 mg/kg previne aumento na densidade da corrente de Ca²⁺ tipo L desencadeada pela cardiotoxicidade induzida por Doxorubicina (Doxo). A - traçados representativos no controle (preto), Doxo (vermelho) e Doxo + H β DL (verde); B - efeito médio do tratamento do H β DL sobre a $I_{Ca,L}$. Os resultados são representados como média $\pm$ DP (n = 5/grupo; célula = 8–9 células/grupo). *p < 0,05 Doxo vs Controle; #p < 0,05 Doxo + H β DL vs Doxo. ANOVA de uma via seguida pós-teste de Bonferroni.

5.7 H β DL preveniu a redução do encurtamento do sarcômero na cardiotoxicidade induzida pela Doxo

A Figura 24 A apresenta traçados representativos dos encurtamentos sarcoméricos nos grupos controle (preto), Doxo (vermelho) e Doxo + H β DL (verde). O grupo Doxo apresentou o encurtamento do sarcômero reduzido em 26,84%, assim também como o tempo para o relaxamento em 50% ficou 36,26% mais rápido, sendo tais valores no grupo tratado com H β DL de 4,54% e 1,58%, respectivamente,

comparados com o grupo controle (Figura 24 B e D). Não houve alteração no tempo de contração (Figura 24 C).

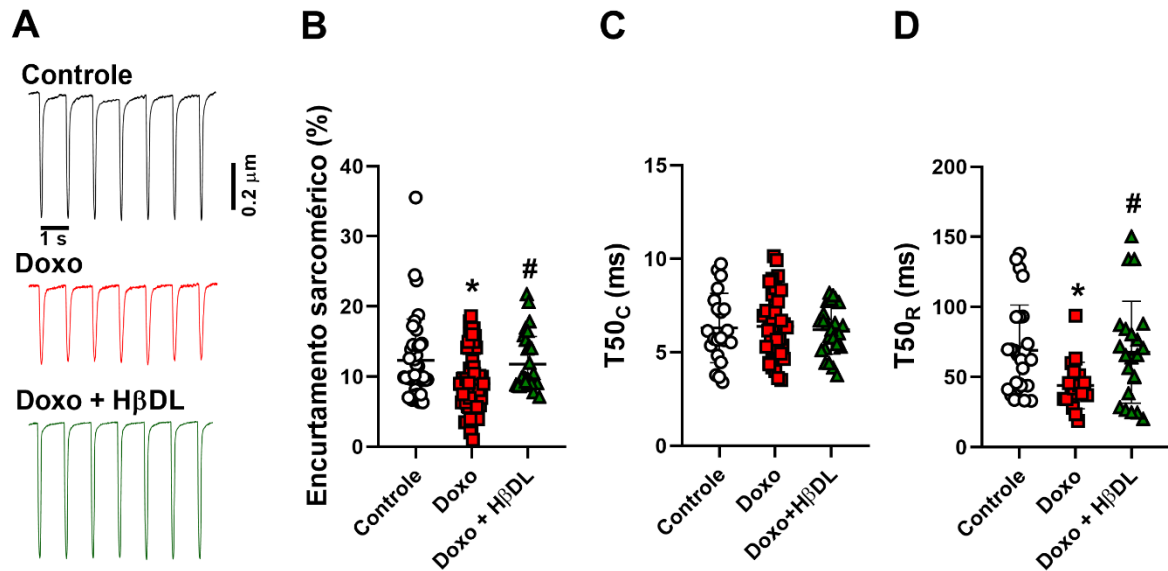


Figura 24. Complexo de inclusão HβDL preveniu a redução do encurtamento do sarcômero na cardiotoxicidade induzida por Doxorubicina (Doxo). A - registros representativos do encurtamento sarcomérico no controle (preto), Doxo (vermelho) e Doxo + HβDL (verde); B - fração de encurtamento do sarcômero; C - tempo em 50% da contração (T50_C); D - tempo em 50% do relaxamento (T50_R). Os resultados são representados como média ± DP (n = 5/grupo; célula = 40–66 células/grupo). *p < 0,05 Doxo vs Controle; #p < 0,05 Doxo + HβDL vs Doxo. ANOVA de uma via seguida pós-teste de Bonferroni.

5.8 HβDL modula a expressão de pCaMKII e OxiCaMKII alteradas no tratamento com Doxo

A CaMKII é conhecida por regular a função de vários canais iônicos e a dinâmica do Ca²⁺ em cardiomiócitos, assim, os marcadores de ativação de CaMKII foram investigados. A Figura 25 A mostra imagens representativas de western blots de tCaMKII (total), pCaMKII (fosforilada), CaMKII oxidada (OxiCaMKII) e GAPDH. Como pode ser visto na Figura 25 B, C e D, não houve diferença nas expressões de CaMKII total, pCaMKII e oxiCaMKII entre os distintos grupos. Todavia, a razão entre pCaMKII/CaMKII total (Figura 25 E) e OxiCaMKII/CaMKII total (Figura 25 F) revelou

um aumento no grupo Doxo em ambas as situações, sendo o H β DL capaz de prevenir tal fenótipo.

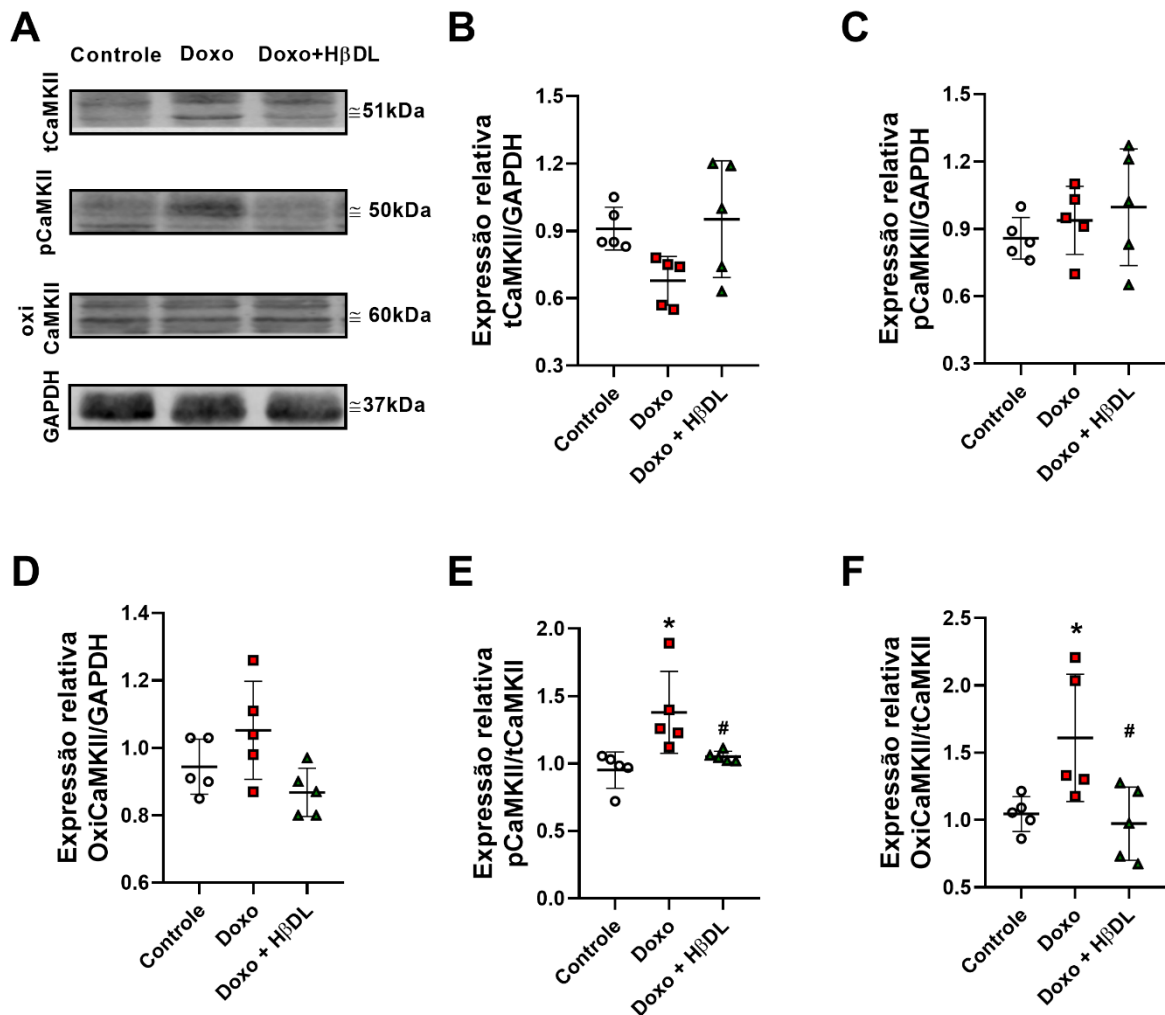


Figura 25. Complexo de inclusão H β DL 10 mg/kg restaurou a razão entre a proteína quinase tipo II dependente de Ca²⁺/calmodulina (CaMKII) fosforilada (pCaMKII), oxidada (OxiCaMKII) e total (tCaMKII), na cardiotoxicidade induzida por Doxorubicina (Doxo). A - imagens representativas de Western blot; B, C e D - análises densit mtricas de tCaMKII, pCaMKII e OxiCaMKII, respectivamente, todos normalizados por GAPDH; E e F, razão entre pCaMKII/tCaMKII e entre OxiCaMKII/tCaMKII, respectivamente, todas normalizadas por GAPDH. Dados resultantes da média dos experimentos realizados em triplicata. Os resultados são representados como média $\pm$ DP (n = 5/grupo). *p < 0,05 Doxo vs Controle; #p < 0,05 Doxo + H β DL vs Doxo. ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni.

5.9 H β DL preveniu o aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) devido a cardiotoxicidade induzida pela Doxo

Um dos mecanismos de ação da cardiotoxicidade induzida pela Doxo é o aumento na geração de EROs, assim, avaliou-se o impacto do tratamento com H β DL em tais. A Figura 26 A mostra imagens representativas da fluorescência do DHE em cardiomiócitos isolados na presença e na ausência de apocinina. Pode-se observar um aumento da fluorescência do DHE nos cardiomiócitos dos animais tratados com Doxo (33,4%) (Fig. 26 B), o que foi prevenido pelo tratamento com H β DL. Experimentos de controle foram realizados utilizando a apocinina, substância comumente utilizada para inibir a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (NOX), que reduz o estresse oxidativo. Estudos mostraram que a apocinina interrompe a atividade de NOX, impedindo sua montagem e diminuindo a produção de superóxido. A Figura 26 B (à direita) mostra a redução, pela apocinina, do aumento da fluorescência causada por EROs no grupo Doxo, indicando um provável envolvimento da NOX nesse processo.

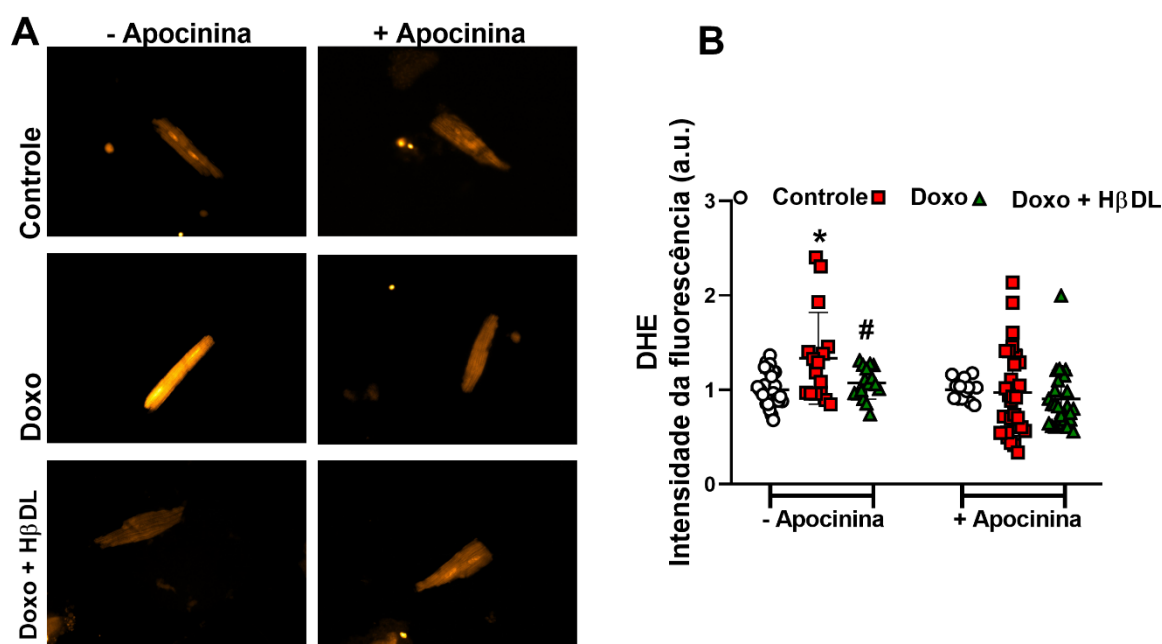


Figura 26. Complexo de inclusão H β DL 10 mg/kg promove redução das espécies reativas de oxigênio (EROs) desencadeada pela cardiotoxicidade induzida por Doxorubicina (Doxo). A - fluorescência do dihidroetídio (DHE) (10 μ M) representativa em cardiomiócitos e B - fluorescência média do DHE nos grupos controle, Doxo e Doxo + H β DL na presença e ausência da apocinina (1 μ M). Os

resultados são representados como média $\pm$ DP (n = 5/grupo, célula = 28 – 35 células/grupo). *p < 0,05 Doxo vs Controle; #p < 0,05 Doxo + H β DL vs Doxo. ANOVA de uma via seguida pós-teste de Bonferroni.

5.10 H β DL preveniu o aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) de origem mitocondrial devido a cardiotoxicidade induzida pela Doxo

Para avaliar a magnitude do aumento de EROs de origem mitocondrial, realizou-se experimentos com as sondas MitoSOX red e Mitotracker green. A Figura 27 A mostra imagens representativas da fluorescência de MitoSOX red e Mitotracker green na ausência e presença de MitoTempo em cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo. MitoTempo é um antioxidante direcionado a EROs produzidas pela mitocôndria (captador de superóxido mitocondrial). Os animais do grupo Doxo tiveram um aumento de aproximadamente 74,3% na fluorescência do MitoSOX red, aumento esse dependente da respiração mitocondrial, uma vez que foi significativamente menor quando o experimento foi realizado após o tratamento das células com MitoTempo (Figura 27 B). Interessante que ao avaliar o MitoTracker (corante mitocondrial se liga a membrana das mitocôndrias independentemente do potencial de sua membrana) houve aumento de 86,5% da fluorescência nos animais tratados com Doxo, indicando um aumento na densidade mitocondrial desses animais, que foi revertida com o tratamento o H β DL.

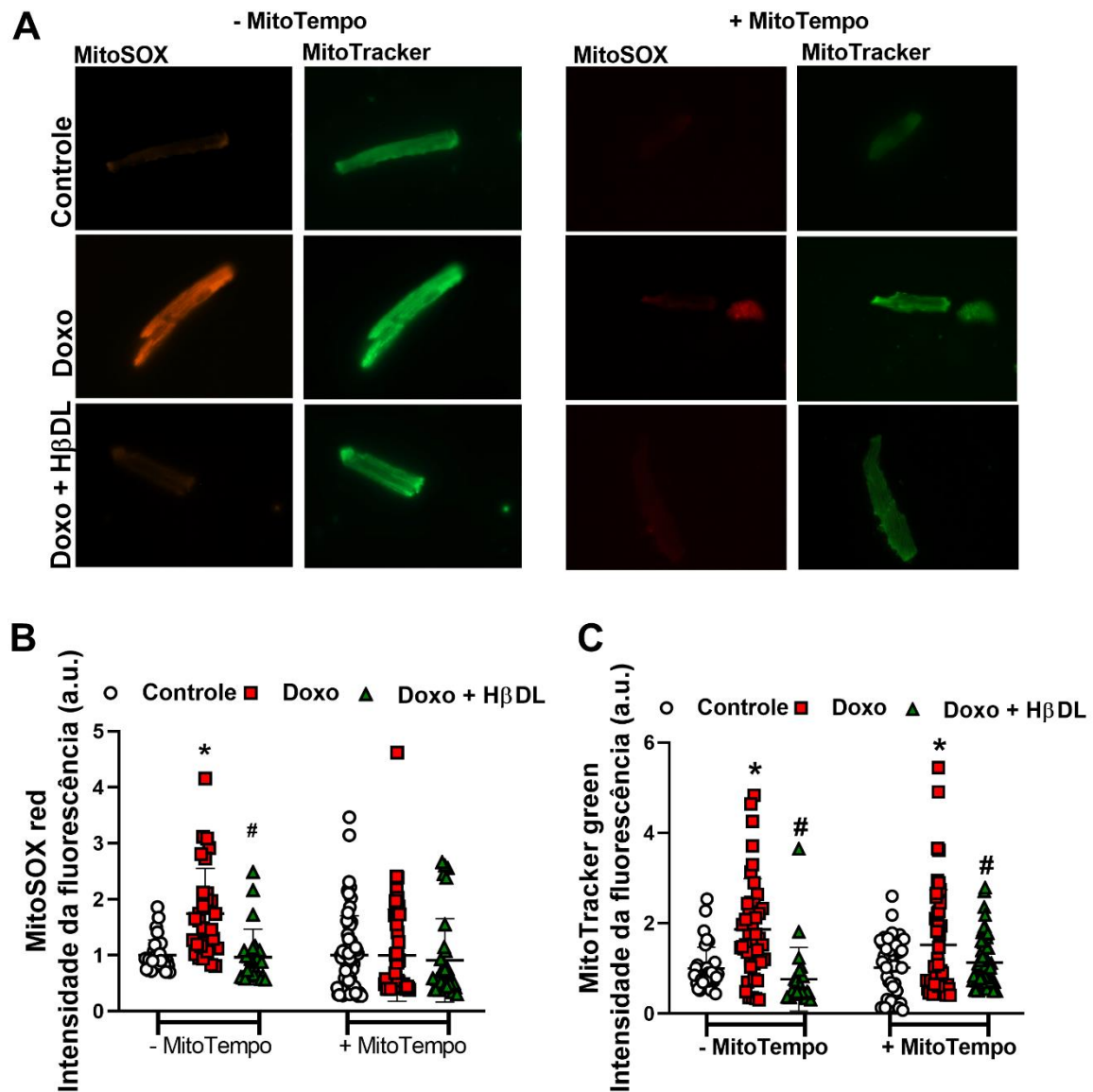


Figura 27. Complexo de inclusão HβDL 10 mg/kg reduz as espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas na mitocôndria, desencadeada pela cardiotoxicidade induzida por Doxorrubicina (Doxo). A - fluorescência do MitoSOX e MitoTracker em cardiomiócitos nos grupos controle, Doxo e Doxo + HβDL na presença e ausência da MitoTempo (25 μM); B - fluorescência média do MitoSOX red (5 μM); C - fluorescência média do MitoTracker Green (200 nM). Os resultados são representados como média ± DP (n = 5/grupo, célula = 37 - 45 células/grupo). *p < 0,05 Doxo vs Controle; #p < 0,05 Doxo + HβDL vs Doxo. ANOVA de uma via seguida pós-teste de Bonferroni.

5.11 H β DL restaura a atividade das enzimas antioxidantes endógenas que foram reduzidas no tratamento com Doxo

Sabendo-se que o estresse oxidativo resulta de um desequilíbrio entre fatores pró-oxidantes e anti oxidantes, avaliou-se a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase citoplasmática (Cu-Zn SOD) e mitocondrial (Mn SOD) e glutathiona peroxidase (GPx) para um entendimento mais minucioso da participação das EROs na cardiotoxicidade induzida pela Doxorubicina e o impacto nessas pelo tratamento com H β DL. Como pode ser observado na Figura 28 A, não houve diferença entre os grupos no que diz respeito à atividade da catalase e Cu-Zn SOD. No entanto, a avaliação da atividade das enzimas antioxidantes Mn SOD e GPx revelou, respectivamente, atenuação destas no grupo Doxo em 37,19% e 39,91% em comparação com o grupo controle, sendo tais situações revertidas pelo tratamento com H β DL (Figura 28 B).

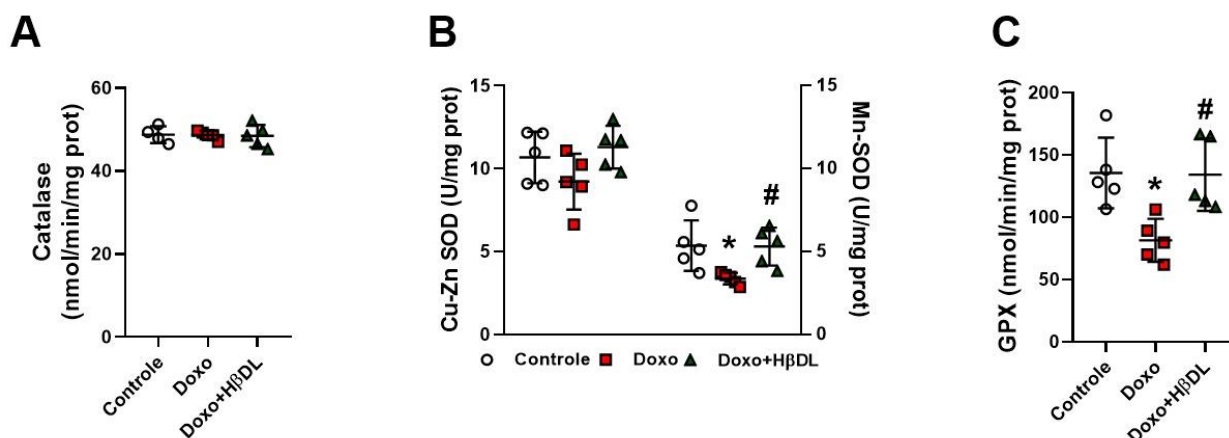


Figura 28. Complexo de inclusão H β DL 10 mg/kg restaura a atividade de enzimas anti oxidantes endógenas prejudicadas na cardiotoxicidade induzida pela Doxorubicina (Doxo). A - atividade da Catalase; B - atividade da superóxido dismutase (SOD) citoplasmática (Cu-Zn) e mitocondrial (Mn); C - atividade da glutathiona peroxidase (GPx). Os resultados são representados como média $\pm$ DP (n = 5/grupo). *p < 0,05 Doxo vs Controle; #p < 0,05 Doxo + H β DL vs Doxo. ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni.

5.12 H β DL supprime vias apoptóticas e peroxidação lipídica induzidas pela Doxo

Verificou-se um aumento da peroxidação lipídica no grupo Doxo, que foi diminuído pelo H β DL (Figura 29 A). Da mesma forma, a expressão de proteínas de vias apoptóticas Bax e Caspase 3 foram aumentadas no grupo Doxo e esse aumento foi prevenido por H β DL (Figura 29 C e F). Não foram observadas alterações significativas na expressão da proteína anti apoptótica Bcl-2 entre os grupos (Figura 29 D). Mas, a relação Bax/Bcl-2 foi aumentada no grupo Doxo e reduzida pelo H β DL (Figura 29 E). Imagens representativas da expressão proteica das proteínas investigadas podem ser vistas na Figura 29 B.

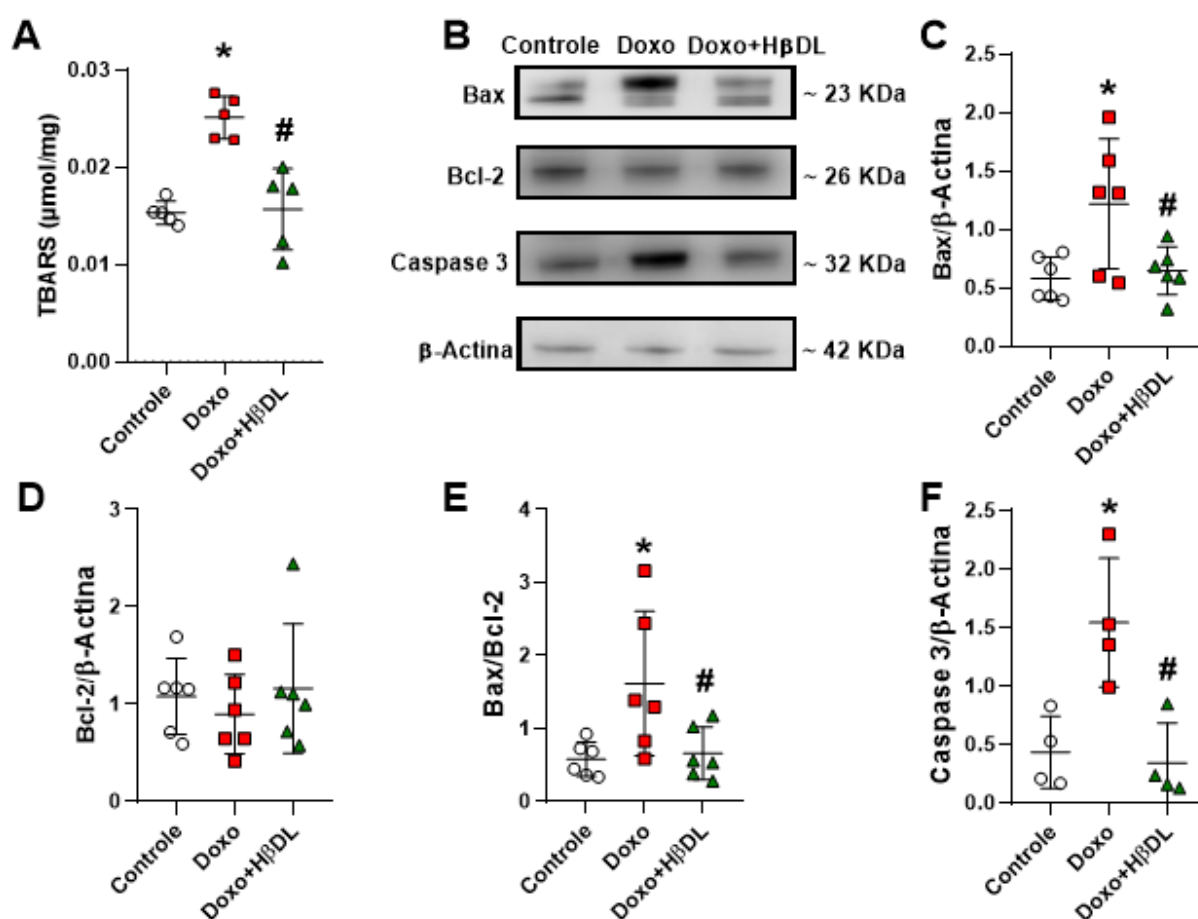


Figura 29. Complexo de inclusão H β DL 10 mg/kg supprime vias apoptóticas e peroxidação lipídica induzidas pela cardiotoxicidade pela Doxorubicina (Doxo).

A - mensuração da peroxidação lipídica pela quantificação de malondialdeído; B - imagem representativa da expressão proteica de Bax, Bcl-2, Caspase 3 e β -actina; C - análise densitométrica da relação Bax/ β -actina; D - análise densitométrica da relação Bcl-2/ β -actina; E - razão Bax/Bcl-2; F, análise densitométrica da relação

Caspase 3/ β -actina. Os resultados são representados como média $\pm$ DP (n = 4-6/grupo). *p < 0,05 Doxo vs Controle; #p < 0,05 Doxo + H β DL vs Doxo. ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni.

5.13 Força de ligação entre DL, CaMKII e cMLCK por *Docking* molecular

Considerando os achados acima, dois alvos foram eleitos como possíveis sítios de ligação e interação com o DL, a CaMKII e a Mylk4. Os estudos de *docking* molecular demonstraram que a energia livre de ligação entre DL e Mylk4 foi de -6,5 kcal/mol, e para a fostamatinibe (um conhecido inibidor da CaMKII) foi de -7,5 kcal/mol. Já para a CaMKII, as energias livres de ligação entre DL e fostamatinibe foram -5,7 e -7,8 kcal/mol, respectivamente.

O estudo de interação revelou ainda que, para os dois alvos, o DL interage potencialmente em regiões diferentes daquelas do inibidor conhecido (Figura 30). Observou-se que DL se liga à Mylk4 por meio de interações alquil-alquil hidrofóbicas com os resíduos Leu113, Val121, Leu233 e Ile246. O fostamatinibe interage por meio de interações eletrostáticas (Asp306), hidrogênio (Arg6, Tyr294 e Asp324), halogênio (Pro302 e Arg319) e hidrofóbicas. Considerando o alvo CaMKII, as interações com DL também são hidrofóbicas, do tipo pi-sigma (Phe467) e alquil-alquil (Ile361, Tyr369, Phe399 e Leu402). Os estudos indicam que fostamatinibe forma interações de hidrogênio com os resíduos Thr446 e Arg 445, além de interações hidrofóbicas com outros aminoácidos desta proteína.

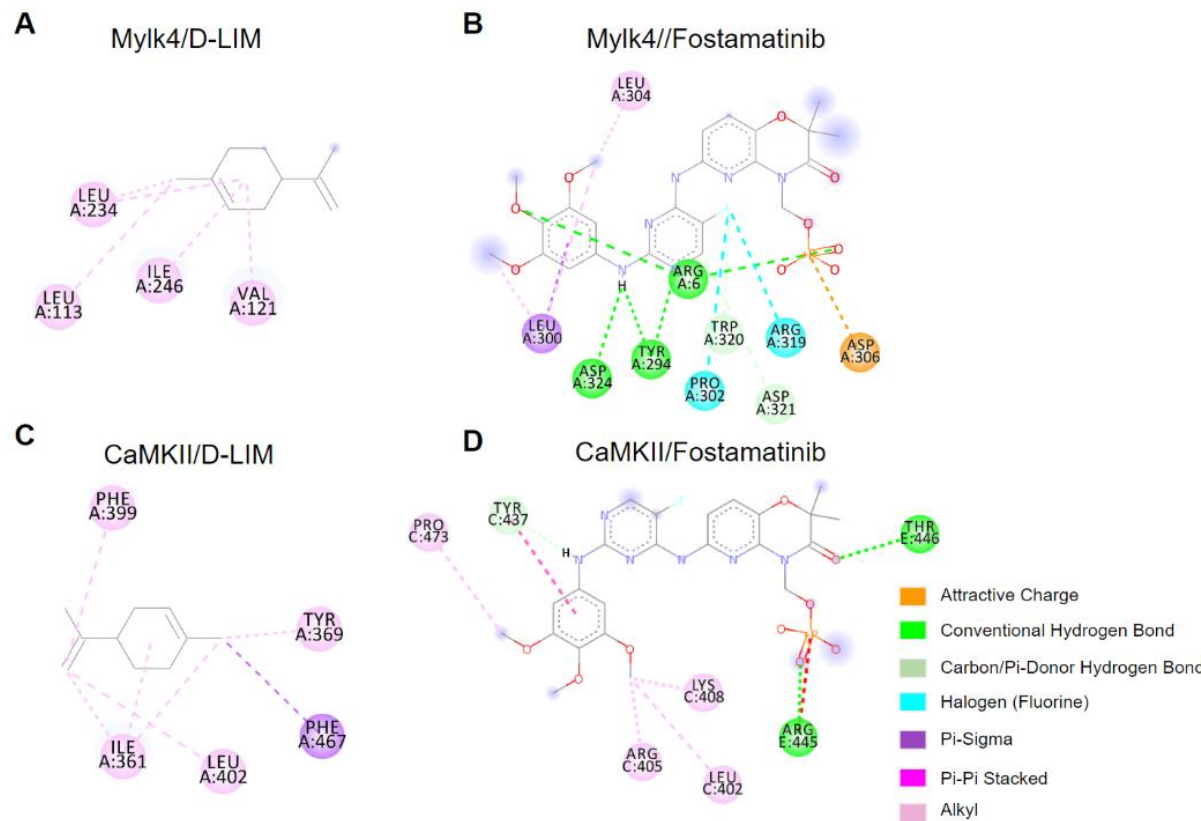


Figura 30. Simulação de interação por *docking* entre DL, CaMKII e cMLCK. A – interação entre quinase da cadeia leve de miosina, membro 4 (Mylk4) e D-limoneno (D-LIM); B – interação entre Mylk4 e Fosfomatinibe; C – interação entre quinase II dependente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII) e D-LIM; D – interação entre CAMKII e Fosfomatinibe. LEU: leucina; ILE: isoleucina; TYR: tirosina; PHE: fenilalanina; VAL: valina; ARG: arginina; ASP: aspartato; TRP: triptofano; PRO: prolina; LYS: lisina.

6 Discussão

Apesar do desenvolvimento de uma série de novas drogas anticâncer, a Doxorubicina (Doxo) ainda é uma das drogas mais utilizadas devido à sua versatilidade, podendo tratar doenças oncológicas sólidas ou hematológicas, isoladamente ou como droga auxiliar. No entanto, devido à cardiotoxicidade da Doxo, sua aplicação torna-se limitada, principalmente quando é necessária uma dose maior do medicamento (AVILA *et al.*, 2019; HAJJAR *et al.*, 2020).

A cardiotoxicidade induzida pela Doxo é escalonada pela dose cumulativa, quanto maior a dose, maior a incidência, que pode atingir até 48% em regimes de tratamento que requerem dose maior (i.e., 700 mg/m²) (CURIGLIANO *et al.*, 2016). Os efeitos da cardiotoxicidade incluem uma variedade de manifestações como alterações no peso corporal, modificações no ECG, lesões cardíacas estruturais, arritmias ventriculares dentre outros (CAI *et al.*, 2019; HAJJAR *et al.*, 2020; LYON *et al.*, 2022; SAWICKI *et al.*, 2021).

Nesse cenário, produtos naturais como o d-limoneno (DL) têm sido amplamente estudados, pois ainda não há tratamento (amplamente aceito) para prevenir lesões cardíacas durante o tratamento anticâncer, principalmente para a cardiotoxicidade induzida por Doxo. Na verdade, um aumento no perfil antioxidante e diminuição nas lesões histopatológicas já foram atribuídas ao DL, administrado por via oral, na proteção da cardiotoxicidade induzida por Doxo (SELVANATHAN; SALAM, 2017); todavia, apesar do efeito benéfico do DL, sua baixa solubilidade aquosa e alta volatilidade dificultam seu uso terapêutico.

Essa característica é comum aos terpenos, e uma solução que tem demonstrado bons resultados são as formulações específicas para sistemas de liberação de fármacos, em especial as ciclodextrinas (SILVA *et al.*, 2021). A literatura mostra melhora dos efeitos do DL complexado com β -ciclodextrinas em distintos contextos (ARAÚJO-FILHO *et al.*, 2017; BARRETO *et al.*, 2017; MARINHO *et al.*, 2022; PEREIRA *et al.*, 2022), apontando assim uma abordagem experimental com potencial implicação clínica. Neste trabalho foi utilizada a hidroxipropil β -ciclodextrina (HP β CD), cujas propriedades, i.e., melhor solubilidade em água e maior estabilidade química, podem torná-la mais vantajosa num contexto clínico. Portanto, levantou-se a hipótese de que a complexação do DL com HP β CD (H β DL) poderia melhorar os efeitos danosos da cardiotoxicidade induzidos por Doxo.

Primeiro, fez-se a validação do modelo experimental e a escolha do tratamento e dose do DL a serem utilizados. Em humanos, o esquema de tratamento com Doxo geralmente é realizado com mais de uma administração (ciclo) do medicamento, com uma dose cumulativa preferencialmente não superior a 450 mg/m² (12 mg/kg) devido ao risco de cardiotoxicidade (CURIGLIANO *et al.*, 2020; HAJJAR *et al.*, 2020; YI *et al.*, 2006). O modelo aqui adotado considerou um esquema que não só fosse capaz de causar cardiotoxicidade e que tivesse o menor impacto possível na mortalidade dos animais (YEUNG *et al.*, 2002), mas que também fosse similar a prática clínica.

Sabe-se que o tratamento com Doxo tem um impacto negativo no peso corporal (LU *et al.*, 2011), e também aumenta o nível plasmático de marcadores de lesão cardíaca, como CK-MB e LDH. Esses parâmetros mostraram-se elevados no modelo experimental aqui apresentado, indicando que a Doxo realmente induziu cardiotoxicidade. Assim, a dose cumulativa de 20 mg/kg, fracionada em 4 administrações, obteve o desempenho almejado.

Fora também realizada, baseado nos biomarcadores de lesão cardíaca, uma curva dose-resposta para avaliar a menor dose de H β DL capaz de induzir cardioproteção. A partir dos experimentos, observou-se que o H β DL - já na menor dose avaliada (10 mg/kg), quando comparado ao DL, exibiu melhor resultado nos marcadores de lesão cardíaca *in vivo*, especialmente em relação ao CK-MB, indicando que a complexação do DL com HP β CD melhora, de fato, as propriedades farmacológicas do DL, o que está em consonância com estudos anteriores (BARRETO *et al.*, 2017; MARINHO *et al.*, 2022; PEREIRA *et al.*, 2022). Salienta-se ainda que a HP β CD sozinha não alterou nenhum dos parâmetros avaliados, o que sugere que o DL no complexo é de fato o responsável pela melhora observada nos marcadores séricos de lesão cardíaca.

O H β DL na dose mínima de 10 mg/kg também demonstrou a capacidade de manter o ganho de peso corporal dos animais similar ao controle. Interessante pontuar que, em situação análoga – cardiotoxicidade induzida pelo medicamento quimioterápico ciclofosfamida, o DL puro também foi capaz de manter o ganho de peso nos animais com ele tratados; todavia, a dose utilizada de DL foi 15 (quinze) vezes maior do que a adotada neste trabalho, e foi administrada diariamente, via oral, por 10 (dez) dias consecutivos (KRISHNAN *et al.*, 2017).

Vale a pena ressaltar que, baseado na eficiência de complexação do DL com HP β CD, que foi de 80%, pode-se estimar que a quantidade de DL complexada na menor dose (10 mg/kg) é de apenas 0,73 mg (MARINHO *et al.*, 2022). Assim, estabeleceu-se que a dose de 10 mg/kg de H β DL seria a melhor dose para os demais experimentos. Neste ponto, vale a pena ressaltar que estudos similares – ação de produtos naturais na cardiotoxicidade induzida por quimioterápicos, utilizaram doses consideravelmente maiores, entre 20 e 750 mg/kg, por vias oral e intraperitonal (HAMZA *et al.*, 2016; KRISHNAN *et al.*, 2017; REHMAN *et al.*, 2014)

Mudanças histológicas estão bem documentadas na cardiotoxicidade induzida por Doxo. Os resultados do modelo adotado nesse trabalho corroboram com achados como infiltrado inflamatório, vacúolos e desarranjo das fibras cardíacas (ENDERSON *et al.*, 2018; M KAMEL *et al.*, 2017; SHIVAKUMAR *et al.*, 2012). Embora alterações mais significativas como o aumento substancial de infiltrado, hipertrofia e degeneração do tecido cardíaco possam ser observadas em modelos de cronicidade (considerando em especial o fator tempo decorrido desde o início do tratamento), os achados histopatológicos deste trabalho foram compatíveis com o tempo de tratamento realizado, corroborando com dados da literatura (CHATTERJEE *et al.*, 2010; COVE-SMITH *et al.*, 2014; M KAMEL *et al.*, 2017).

Produtos naturais como flavonoides e terpenos demonstraram capacidade de prevenção de alterações histológicas no sistema cardiovascular causadas por hipercolesterolemia, hipertensão e infarto agudo do miocárdio (NOUR *et al.*, 2017; SWIDERSKI *et al.*, 2023). O DL evidenciou habilidade na prevenção de danos estruturais/alterações histológicas pulmonares, gástricas, hepáticas, renais e cardíacas, com redução de infiltrado celular, fibrose e edema (ANANDAKUMAR; KAMARAJ; VANITHA, 2021; DURÇO *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2021), inclusive num contexto de cardiotoxicidade causada pelo quimioterápico ciclofosfamida (KRISHNAN *et al.*, 2017). Neste estudo, o complexo H β DL foi capaz de reduzir o infiltrado inflamatório e edema intersticial causados pela cardiotoxicidade induzida pela Doxo, corroborando assim com a manutenção da estrutura normal dos cardiomiócitos.

Danos histológicos no tecido cardíaco podem ser refletidos no ECG. De fato, alterações eletrocardiográficas são consideradas frequentes na cardiotoxicidade induzida por Doxo, como taquicardia sinusal, complexos ventriculares prematuros e prolongamento do intervalo QTc (FRADLEY *et al.*, 2021), e tais alterações foram

observadas no grupo Doxo. Os animais tratados com Doxo + H β DL mostraram não apenas um perfil geral de ECG melhorado, mas especificamente, o H β DL foi capaz de reduzir o prolongamento do QTc, um indicador importante da cardiotoxicidade induzida por Doxo, além de importante preditor de arritmias quando prolongado (BENJANUWATTRA *et al.*, 2020; KINOSHITA *et al.*, 2021).

Importante ressaltar que o tempo decorrido para que houvesse a alteração do QTc, apresentada neste trabalho no 15º dia (término do tratamento com Doxo), apresenta similaridades com o que fora relatado em estudos anteriores que demonstraram alterações histológicas moderadas (DULF *et al.*, 2023; SANDAMALI *et al.*, 2023; VILLANI *et al.*, 1986). Ademais, considerando que infiltrado inflamatório, vacúolos e desarranjo das fibras cardíacas, como também fibrose miocárdica, implicam em alterações eletrocardiográficas incluindo do QTc (ABUSHOUK *et al.*, 2017), percebe-se que o tempo para a apresentação de tal alteração foi compatível com o esquema de cardiotoxicidade aguda praticado, como evidenciado na histologia.

É interessante notar o efeito de alguns produtos naturais sobre a atividade elétrica cardíaca. Por exemplo, estudos com constituintes do extrato de Ginkgo biloba (gingkolídeos e bilobalide), mirtenol, ácido p-cumárico, β -cariofileno, carvacrol e o próprio DL demonstraram supressão da elevação do segmento ST e redução da duração do intervalo QTc em situação fisiológica e também frente a patologias como injúria miocárdica por isquemia reperfusão e infarto agudo do miocárdio (BRITTO *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2017; DURÇO *et al.*, 2019; NAGOOR MEERAN; JAGADEESH; SELVARAJ, 2015; ROY; STANELY MAINZEN PRINCE, 2013; SANTOS *et al.*, 2014; YOUNIS; MOHAMED, 2019).

Arritmias com risco de vida, como taquicardia ventricular (TV) e fibrilação ventricular (FV), são mais prováveis de ocorrer com prolongamento do intervalo QTc (HAJJAR *et al.*, 2020), e, em contextos de arritmia induzida por Bay K 8644, o DL mostrou-se detentor de propriedades antiarrítmicas em suas formas pura e complexada com ciclodextrina (MARINHO *et al.*, 2022; NASCIMENTO *et al.*, 2019). Assim, questionou-se a atuação do H β DL no contexto de arritmia grave, sendo para tal realizado, *in vivo*, um protocolo de estresse cardíaco farmacológico com dobutamina (MILLER; ASKEW; ANAVEKAR, 2014; ZHANG; ZHANG, 2020).

A dobutamina é um agonista β 1-adrenérgico comumente utilizado na prática clínica para rastrear o início da disfunção cardíaca (BOUNTIOUKOS *et al.*, 2003;

COTTIN *et al.*, 2000; MITRY *et al.*, 2020). Embora não tenha havido diferença no aumento da frequência cardíaca entre os grupos após a administração de dobutamina, é importante salientar que, comparados ao controle, antes de serem desafiados com dobutamina, os animais do grupo do Doxo + H β DL tiveram um aumento na frequência cardíaca de apenas 2,9%, sendo esse aumento no grupo Doxo de 17%.

Essa taquicardia sinusal apresentada nos animais do grupo Doxo é uma característica própria do tratamento, que pode ser atribuída ao desequilíbrio autonômico cardíaco causado muito provavelmente pelo estresse oxidativo originado pela Doxo, com aumento da estimulação simpática e diminuição da parassimpática (CHATTERJEE *et al.*, 2010; POTOČNIK *et al.*, 2017), o que pode justificar, portanto, a frequência cardíaca dos animais do grupo Doxo superior ao grupo controle no baseline do experimento (animais em “repouso”).

Nosso grupo já demonstrou a capacidade do DL no restabelecimento do status redox frente a patologias cardíacas (DURÇO *et al.*, 2019). Essa mesma via também pode ser apontada como promotora de eventos arrítmicos, situação essa em que o DL também já demonstrou sua eficácia (MARINHO *et al.*, 2022; NASCIMENTO *et al.*, 2019). Importante salientar que neste trabalho, o tratamento com H β DL foi capaz de reduzir a incidência e a severidade das arritmias *in vivo* evocadas pelo protocolo de estresse farmacológico.

De fato, terpenos têm exibido propriedades antiarrítmicas numa ampla gama de contextos. Estudos anteriores demonstraram que vários terpenos como R(+)-pulegona, geraniol, farnesol e (-)-carvona bloqueiam diretamente os canais de Ca²⁺ tipo L ou diminuem a I_{Ca,L} em cardiomiócitos (DE CERQUEIRA *et al.*, 2011; DE MENEZES-FILHO *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2022; SOUZA *et al.*, 2019).

Como o H β DL foi capaz de atenuar alterações no ECG e a suscetibilidade a arritmias *in vivo*, realizou-se uma análise celular e molecular para desvendar o potencial mecanismo envolvido na cardioproteção induzida pelo H β DL. Inicialmente avaliou-se o potencial de ação (PA) em cardiomiócitos do endocárdio do ventrículo esquerdo. Observou-se que a amplitude do PA e a inclinação máxima da fase 0 não foram alteradas, e como ambos os parâmetros estão correlacionados com a corrente de sódio (I_{Na}), pode-se inferir que não há alteração no pico da referida corrente (BENJANUWATTRA *et al.*, 2020). Além disso, observou-se que a duração do PA foi aumentada no grupo Doxo, como também a dispersão desta duração - resultado

este que está bem alinhado com o aumento do intervalo QTc medido no ECG, e que o H β DL foi capaz de reverter.

O aumento no tempo de repolarização combinado com a dispersão da duração do PA são importantes substratos para ocorrência de arritmias (MUSTROPH; NEEF; MAIER, 2017; SOUZA *et al.*, 2022). Além disso, outro gatilho importante para arritmias são as despolarizações tardias (DADs), que ocorrem durante o intervalo diastólico e podem precipitar extrassístoles (MUSTROPH; NEEF; MAIER, 2017). De fato, quando categorizadas, a maioria das arritmias observadas no grupo Doxo foram PAs espontâneos aleatórios (*triggered*) e, curiosamente, o H β DL foi capaz não apenas de aumentar o percentual de células não arritmicas, mas também de diminuir o percentual de *triggered*.

Alguns terpenos têm se mostrado capazes de modificar o PA cardíaco. O farnesol, por exemplo, na concentração de 50 μ M, reduziu a duração do PA em 90% da repolarização, assim como o H β DL. As alterações na duração do PA induzidas pelo H β DL podem indicar modificações nas correntes de potássio (I_K), responsáveis pela fase de repolarização, ou na $I_{Ca,L}$ (SOUZA *et al.*, 2019).

Considerando o efeito da Doxo bem como de alguns terpenos na dinâmica do Ca^{2+} intracelular (ABUSHOUK *et al.*, 2017), prosseguiu-se investigação mais aprofundada nessa vertente. É notório o fato do Ca^{2+} ser essencial para o sistema de excitação-contração cardíaco, sendo o transiente intracelular de Ca^{2+} (variação na concentração de Ca^{2+} intracelular livre por um determinado período de tempo) responsável por estimular a contração e o relaxamento cardíaco (BERS, 2002). De fato, muitas doenças cardíacas, a exemplo da insuficiência cardíaca e infarto, comprovadamente podem afetar o manuseio intracelular de Ca^{2+} em distintos pontos. (ALVARADO *et al.*, 2019; LANDSTROM; DOBREV; WEHRENS, 2017; REID; BIRSTOW; BOLLAND, 2017).

Os canais para Ca^{2+} tipo L são fundamentais na condução iônica que desencadeia a contração cardíaca. Dessa forma, a investigação foi direcionada à ação do H β DL na $I_{Ca,L}$ e no transiente global de Ca^{2+} intracelular, onde fora observado que ambos se mantiveram normais pelo tratamento com H β DL, meios que podem ter sido responsáveis pela alteração do PA nos animais tratados com Doxo.

No tratamento H β DL, isso também pode ter contribuído com a redução dos transientes completos fora de estimulação, as ondas de Ca^{2+} . Independentemente do

ponto em que houve alteração no manuseio do Ca^{2+} , o fato é que uma sobrecarga desse íon aumenta as chances de abertura do RyR2, não apenas favorecendo os “vazamentos” de Ca^{2+} do RS, conhecidos como *sparks*, mas também as ondas de Ca^{2+} , que podem culminar em arritmias desencadeadas por DADs e *triggered*, levando à deterioração cardíaca (WEISS *et al.*, 2010). Situação essa prevenida pelo H β DL.

A sobrecarga de Ca^{2+} é prejudicial à função cardíaca, incluindo sua maquinaria contrátil. De fato, o aumento do transiente de Ca^{2+} pode indicar aumento do encurtamento do sarcômero, já que há mais Ca^{2+} livre no citosol (e o Ca^{2+} se liga na troponina C), espera-se um aumento na amplitude de contração (EISNER *et al.*, 2017). Todavia, o (aumento do) encurtamento sarcomérico não acompanhou o aumento do transiente de Ca^{2+} no grupo Doxo. Isso pode ser explicado ao se considerar que um miocárdio doente, como no caso do grupo Doxo, tem suas propriedades musculares comprometidas, sendo neste cenário o transiente $[\text{Ca}^{2+}]_i$ decorrente da dissociação rápida de Ca^{2+} da troponina C, o que contribui com ondas de Ca^{2+} que levarão a um acoplamento excitação-contração não uniforme entre pontos saudáveis e deteriorados do miocárdio (TER KEURS *et al.*, 2008). Ainda, há relatos de que no miocárdio doente como no grupo Doxo, a atividade diastólica espontânea (após um PA) aumenta com uma estimulação de alta frequência, como também há o aumento da frequência cardíaca (DAVIDOFF *et al.*, 2004), sendo essas características aqui apresentadas.

O H β DL, além de prevenir o aumento na amplitude do transiente de Ca^{2+} , restaurar seu tempo de decaimento, reduzir a incidência de ondas de Ca^{2+} e prevenir o aumento da $I_{\text{Ca,L}}$ – eventos interdependentes, também preveniu o encurtamento do sarcômero e restaurou seu tempo para atingir 50% do relaxamento. Logo, como grande parte do relaxamento cardíaco deve-se a SERCA2a, é razoável pensar que o HBDL pode ter atuado de forma a restaurar o tempo de recaptação de Ca^{2+} por esta, e ao permitir maior tempo do Ca^{2+} no citosol, oportunizou uma fração de encurtamento sarcomérico adequado.

O Ca^{2+} é um segundo mensageiro que está envolvido em muitas das sinalizações moleculares no cardiomiócito, dentre elas, encontra-se a ativação da quinase II dependente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII). A CaMKII controla muitas funções na célula cardíaca; de fato, o estado de hiperativação da CaMKII é um dos

protagonistas na cardiotoxicidade induzida por Doxo (IKEDA *et al.*, 2019; KONG *et al.*, 2022).

A CaMKII pode fosforilar o canal para Ca^{2+} do tipo L, aumentando a corrente de despolarização; fosforila também a fosfolambam (PLB), inibindo sua atividade e, conseqüentemente, levando a maior recaptação de Ca^{2+} pelo RS; fosforila o RyR2 e assim aumenta o vazamento de Ca^{2+} e o vazamento de Ca^{2+} do RS aumenta a concentração da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (BENJANUWATTRA *et al.*, 2020; IKEDA *et al.*, 2019; MUSTROPH; NEEF; MAIER, 2017). Combinados, todos esses efeitos favorecem a ocorrência de aumento do transiente de Ca^{2+} , aumento da recaptação de Ca^{2+} e corroboram com o aparecimento das ondas de Ca^{2+} e DADs; e todos esses eventos foram não apenas observados no grupo tratado com Doxo, mas principalmente, foram atenuados no grupo Doxo + H β DL.

A CAMKII tem sido apontada como possível alvo terapêutico em diversas patologias, incluindo a cardiotoxicidade induzida por Doxo (NASSAL; GRATZ; HUND, 2020; ROBISON, 2014). Uma quantidade significativa de estudos fundamentam a CaMKII como um regulador central em vias cruciais para a remodelação cardíaca e arritmias (NASSAL; GRATZ; HUND, 2020) – a ativação da CaMKII está envolvida na gênese de diversos tipos de arritmias, sendo sua ativação atribuída à fosforilação, oxidação, O-GlcNAcilação e S-nitrosilação (NASSAL; GRATZ; HUND, 2020).

Alguns produtos naturais têm sido reportados com potencial interação com a CAMKII. Por exemplo, a curcumina e a costulônida foram capazes de inibir a ativação por fosforilação da CAMKII em estudos de neuroproteção (LIU *et al.*, 2023; MAYADEVI *et al.*, 2012). Já num contexto de infarto induzido por isoproterenol, nosso grupo demonstrou que o S-limoneno foi capaz de reduzir a CAMKII oxidada (RHANA *et al.*, 2022). Ainda, um mecanismo de proteção dos produtos naturais que está bem estabelecido na cardiotoxicidade por Doxo é a modulação intracelular de cálcio (ABUSHOUK *et al.*, 2017).

Considerando então não apenas a forma de ativação da CAMKII pelos produtos naturais mas também os mecanismos de ação pelos quais o Doxo induz a cardiotoxicidade, percebe-se que os processos de fosforilação e oxidação da CAMKII têm sido bem explorados (IKEDA *et al.*, 2019; KONG *et al.*, 2022; SAG *et al.*, 2011; TSCHESCHNER *et al.*, 2019). Tal estado de ativação pode ser avaliado através da razão entre a forma total da CaMKII e a forma que se pretende avaliar. Neste trabalho foi evidenciado a ativação da CaMKII por ambos os mecanismos:

fosforilação e oxidação, com redução da ativação pelo H β DL em ambos os casos. Nesse ponto, vale lembrar que a ativação da CAMKII mediada por oxidação desempenha importante papel frente a condições cardíacas patológicas, uma vez que implica na manutenção de sua conformação ativa. Todavia, sua influência no desdobramento da doença cardíaca permeia da ciclagem do Ca⁺² à função mitocondrial, incluindo a entrada de Ca⁺² nessa organela culminando em morte celular (NASSAL; GRATZ; HUND, 2020).

Como dito anteriormente, os canais para Ca²⁺ do tipo L são os principais canais dependentes de voltagem responsáveis pelo influxo de Ca²⁺ nas células cardíacas. A sobrecarga intracelular do íon cálcio, além de alterar diretamente características contráteis do miocárdio, também pode prejudicar a função mitocondrial e aumentar a geração de EROs, e estas últimas, por sua vez, também podem modular os canais para Ca²⁺ do tipo L, aumentando sua atividade (BERTERO; MAACK, 2018). Assim, o aumento do Ca²⁺ intracelular controla diversos processos intracelulares no cardiomiócito, estando fortemente vinculado a mecanismos geradores de estresse oxidativo. Por conta disso, procurou-se avaliar o estresse oxidativo citoplasmático e mitocondrial.

O aumento da intensidade na fluorescência por DHE no grupo Doxo, revertido na presença de apocinina, aponta para uma fonte específica de EROs, a saber, superóxido advindo da NOX. Esse achado é corroborado pelos dados obtidos com os experimentos realizados com os corantes MitoSOX red e MitoTracker green, ambos fluoróforos específicos para a mitocôndria, avaliando respectivamente geração de espécie reativa e massa mitocondrial (RHANA *et al.*, 2022).

Embora a Doxo prejudique a biogênese mitocondrial, o que conduziria a um raciocínio parcial de redução de massa mitocondrial (KALYANARAMAN, 2019), faz-se necessário lembrar que ela também prejudica a função mitocondrial e por conseguinte a geração de ATP (GORINI *et al.*, 2018; TARPEY *et al.*, 2019), logo, tem-se o racional de um aumento quantitativo (massa mitocondrial) a fim de compensar uma performance (geração de ATP) prejudicada, raciocínio este comprovado quando o aumento na fluorescência de MitoSOX foi revertido na presença de um *scavenger* de superóxido de origem mitocondrial, o MitoTempo. (PEOPLES *et al.*, 2019). A metodologia empregada (estudo *in vitro* agudo) não permitiu que o mesmo efeito fosse observado na sonda MitoTracker na presença de

MitoTempo. Assim, a Doxo se acumula na mitocôndria dos cardiomiócitos, prejudica seu funcionamento e gera espécies reativas.

Achados de um estudo recente com o produto natural ferruginol na cardioproteção da toxicidade induzida por Doxo corroboram com os resultados aqui apresentados. Os efeitos cardioprotetores no referido estudo derivaram da preservação da função mitocondrial por redução de espécies reativas na mesma, através do aumento de RNAm da sirtuína 1 (SIRT1) e do receptor-gamacoativador-1alfa ativado por proliferador de peroxissoma (PGC-1 α), o que atenuou a redução na quantidade de mitocôndrias (LI *et al.*, 2021).

Algumas enzimas que produzem EROs durante a respiração celular também possuem um mecanismo de ativação dependente de Ca^{2+} em condições de sobrecarga de Ca^{2+} a NADPH oxidase, por exemplo, potencializa a produção de EROs gerando estresse oxidativo.

A citotoxicidade e outros efeitos biológicos de compostos naturais podem ser em parte atribuídos à inibição da NADPH-oxidase e outros sistemas enzimáticos mitocondriais (BETANCUR-GALVIS *et al.*, 2003b, 2003a; BOHMONT *et al.*, 1987; HODNICK *et al.*, 1987; HODNICK; DUVAL; PARDINI, 1994). Compostos naturais demonstraram poder de inibição da cadeia respiratória em bactérias e coração bovino (SCOTTI *et al.*, 2010; TAPIA *et al.*, 2004). O ácido carnósico, por exemplo, durante a cardiotoxicidade induzida por Doxo, demonstrou diminuir a expressão da NOX 2 e NOX 4, complexos proteicos fortemente relacionados à produção de radicais livres (ZHANG; YANG; ZHANG, 2019). O limoneno em específico, num estudo sobre suas propriedades antimicrobianas contra o *Staphylococcus aureus*, foi capaz não apenas de reduzir a atividade dos complexos da cadeia respiratória como também reduzir a expressão de proteínas relacionadas a este complexo (HAN; SUN; CHEN, 2020).

De maneira geral, o aumento dos níveis de Ca^{2+} mitocondrial amplifica a atividade respiratória e eleva a produção de EROs mitocondriais (BERTERO; MAACK, 2018; LANDSTROM; DOBREV; WEHRENS, 2017; LUCZAK; ANDERSON, 2014). Assim, depreende-se que o aumento do Ca^{2+} intracelular, assim também como a geração e EROs, estão relacionados a múltiplos mecanismos ao mesmo tempo que se relacionam entre si.

Tal entendimento faz-se importante uma vez que comprovadamente o H β DL inibiu o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ causado, por mecanismos diversos, pela Doxo. Todavia,

o H β DL pode ainda atuar através da atenuação da produção de EROs induzida pela Doxo. Neste trabalho, observou-se que a cardiotoxicidade induzida pela Doxo resultou no aumento da produção de EROs juntamente com a atividade reduzida da GPx. A GPx é responsável por reduzir o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, sendo a principal enzima antioxidante na maioria das células, inclusive nos cardiomiócitos (BERTERO; MAACK, 2018; GORDAN *et al.*, 2020; PEOPLES *et al.*, 2019). Na verdade, há evidências que suportam que a deficiência na atividade da GPx resulta em comprometimento da função cardíaca (BLANKENBERG *et al.*, 2003).

Fora aqui demonstrado, por medições *in situ*, que o tratamento com H β DL protege o coração contra a geração de EROs no citoplasma, bem como nas mitocôndrias, associado a uma elevação significativa na atividade da enzima GPx e MnSOD, e redução da lipoperoxidação. A peroxidação lipídica, embora seja de ocorrência corriqueira em baixos níveis, pode levar à deterioração oxidativa da membrana celular, seguida de lesão e morte celular, quando as moléculas oxidativas que reagem com os lipídios não são devidamente neutralizadas por agentes antioxidantes (DURÇO *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2005).

Das propriedades apresentadas pelos compostos naturais, uma das mais bem estabelecidas é a atividade antioxidante. De fato, há uma infinidade de compostos capazes de atuar na prevenção de fatores oxidantes e na promoção de fatores antioxidantes numa gama de patologias, incluindo cardíacas (ABDUL GHANI *et al.*, 2023; ABUSHOUK *et al.*, 2017). Na cardiotoxicidade por tetracloreto de carbono (CCl₄), o DL na dose de 200 mg/kg diminuiu a peroxidação lipídica e aumentou a atividade de enzimas antioxidantes cardíacas (ALSAFFAR *et al.*, 2022).

A literatura retrata a mitigação do estresse oxidativo por redução da peroxidação lipídica e aumento da atividade das enzimas antioxidantes, especialmente SOD, GSH e GPx, além de regular positivamente genes envolvidos no metabolismo dessas enzimas e aumentar a expressão importantes fatores de transcrição das mesmas, como o Nrf2 no contexto da cardiotoxicidade induzida por Doxo (ARAFAT *et al.*, 2014; CHOI *et al.*, 2008a; MANTAWY *et al.*, 2014). Durante a cardiotoxicidade induzida por ciclofosfamida, essas mesmas propriedades pró equilíbrio redox foram reportadas pelo tratamento com DL (KRISHNAN *et al.*, 2017).

Outros produtos naturais também têm demonstrado capacidade antioxidante a nível mitocondrial. O resveratrol, por exemplo, aumentou a atividade da MnSOD e reduziu as EROS produzidas pela mitocôndria, além de ativar fatores relacionados à

biogênese mitocondrial em cardiomiócitos de cultura. Já o extrato de alcaçuz mostrou-se efetivo contra o estresse oxidativo e apoptose mitocondrial na cardiotoxicidade induzida por Doxo em células H9c2 (YU *et al.*, 2018).

O tratamento com H β DL preveniu a peroxidação lipídica observada no grupo Doxo, como evidenciado pelo método TBARs. Assim, entende-se que a proteção oferecida pelo tratamento com H β DL contra a cardiotoxicidade induzida pela Doxo advém da melhora na atividade de fatores antioxidantes e da diminuição de fatores oxidantes. É importante ressaltar ainda que a peroxidação lipídica é um dos eventos iniciais e principais na cardiotoxicidade induzida pela Doxo (CHRISTIDI; BRUNHAM, 2021; HRELIA *et al.*, 2002), que contribui de forma direta com eventos apoptóticos (RAWAT *et al.*, 2021), e que o H β DL foi capaz de suavizar.

Da mesma forma, ambientes enriquecidos com EROs, como acontece na administração da Doxo, também induzem danos oxidativos que levam à ativação de vias pró-apoptóticas (PAPACONSTANTINO, 2019). Assim, o aumento da produção de EROs leva não apenas ao aumento do estresse oxidativo *per se*, mas também à ativação de vias de sinalização pró-apoptótica.

As vias apoptóticas fazem-se presentes na cardiotoxicidade induzida pela Doxo, assim, investigou-se o comportamento de tais vias. Aqui fora demonstrado um aumento na expressão de Bax e Caspase 3 no grupo Doxo, acompanhado de uma razão Bax/Bcl-2 também aumentada, situações que o H β DL foi capaz de prevenir. Logo, as vias apoptóticas exibidas no grupo Doxo foram moduladas pelo H β DL por impedir o aumento de proteínas pró-apoptóticas, assim como previamente demonstrado (DURÇO *et al.*, 2019). De fato, alguns dos mecanismos moleculares apontados pelos quais os produtos naturais impedem a apoptose durante o tratamento com Doxo são a inibição da clivagem de caspases como as -3, -7, -9 e do aumento na expressão da proteína p53 (CHOI *et al.*, 2008b; PSOTOVÁ *et al.*, 2005).

A literatura tem reportado a ação antiapoptótica de produtos naturais por inibição das vias de apoptose extrínseca e intrínseca. Todavia, é importante lembrar que ambas as vias convergem para uma mesma caspase efetora, e.g. caspase-3, mostrando-se o H β DL exitoso na inibição da expressão da caspase 3 neste trabalho.

Considerando como o H β DL foi capaz de atuar sobre o protagonismo do Ca²⁺ durante a cardiotoxicidade induzida por Doxo, a Mylk4 e a CaMKII foram escolhidas

para realização do estudo *in silico*, como possíveis alvos de interação com o DL. Para explorar essa possibilidade, uma análise de docking molecular foi realizada.

De maneira geral, observou-se que o DL possui afinidade semelhante ao inibidor conhecido da Mylk4 e CaMKII, o fostamatinibe (ROLF *et al.*, 2015). Interessantemente, a energia de ligação do DL com a Mylk4 foi maior do que a do fostamatinibe. Além disso, as energias de ligação aqui previstas – DL/ Mylk4 -6,5 kcal/mol e DL/CAMKII 5,7 kcal/mol, são comparáveis a outros produtos naturais e seus respectivos alvos também importantes para doenças cardiovasculares. Por exemplo, os compostos naturais curcumina, resveratrol, quercetina e eucaliptol demonstraram energia de ligação similar com o fator-1 derivado de células estromais de quimiocina homeostática (SDF-1) e seus receptores, importantes na doença arterial coronariana (MURAD; ALQURASHI; HUSSIEN, 2022).

Outro ponto interessante são os resíduos de aminoácidos pelos quais há a interação entre o DL e a Mylk4 e CAMKII, na sua maioria, aminoácidos de cadeia ramificada – leucina, isoleucina e valina. Tais aminoácidos fazem agrupamentos hidrofóbicos que contribuem com a estabilidade da proteína em estados de dobramento, além da estrutura proteica em si (KATHURIA *et al.*, 2016).

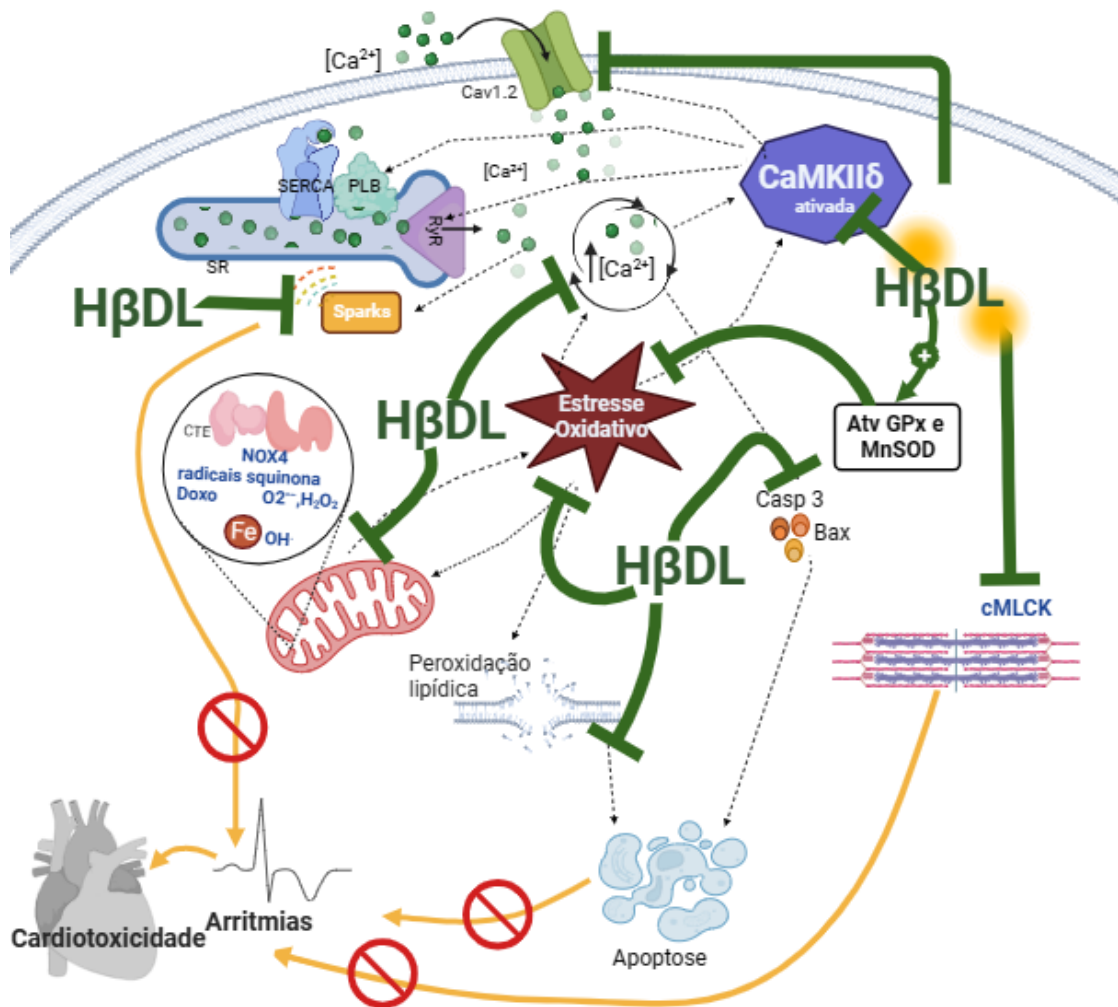
Houve também interação com a tirosina, aminoácido pertencente à tríade responsável pela fosforilação de proteínas, processo esse importante para a manutenção da função cardíaca (WEBER *et al.*, 2015). Por exemplo, recentemente foi demonstrado que a alteração da fosforilação da tirosina mostrou ter implicação direta em modelos de hipertrofia cardíaca (XU *et al.*, 2022).

Assim, especula-se que o DL poderia agir de maneira a evitar que a Doxo reduza a atividade da Mylk4, responsável por fosforilar a MLC2/aumentar sua sensibilidade ao Ca^{2+} , resultando em maior amplitude de contração e cinética de contração relaxamento. Já em relação a CAMKII, o DL poderia estar inibindo sua ativação, reduzindo o nível intracelular de Ca^{2+} o que, em última instância, diminuiria a incidência de arritmias.

Além disso, a análise de docking demonstrou que o DL potencialmente interage em diferentes regiões do inibidor nos dois alvos selecionados. Isso pode ser explicado pelas diferenças de natureza química dos ligantes. Enquanto o DL é apolar e, portanto, tem maior afinidade com regiões da proteína que possuem resíduos hidrofóbicos, o fostamatinibe é polar.

Os resultados indicam que DL tem afinidade suficiente para interagir com os alvos selecionados, CaMKII e Mylk4, e que as ligações ocorrem em locais diferentes daqueles usados pelo inibidor conhecido. Todavia, para confirmar estes achados, estudos *in vitro* são necessários.

Em conjunto, nossos resultados demonstram que durante a cardiotoxicidade induzida por Doxo, o H β DL na dose de 10 mg/kg foi capaz de prevenir o aumento em biomarcadores de lesão cardíaca, manter o ganho de peso corpóreo dos animais, prevenir alterações estruturais no tecido cardíaco, e no perfil eletrocardiográfico, diminuir o percentual de arritmia *in vivo* e *in vitro*, reduzir ondas de Ca²⁺, prevenir alterações no potencial de ação e na dinâmica de contração/relaxamento do



cardiomiócito, impedir o aumento da I_{Ca} , inibir a ativação da CaMKII, melhorar o perfil redox e suprimir vias apoptóticas. As vias pelas quais o H β DL atuou como cardioprotetor na cardiotoxicidade induzida por Doxorubicina podem ser vistas na Figura 31.

Figura 31. Mecanismos pelos quais o H β DL previne a cardiotoxicidade induzida por Doxorubicina. No manejo de Ca^{2+} , o H β DL diminui a densidade da $\text{I}_{\text{Ca,L}}$, o que leva à diminuição da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, além da redução do estímulo em outros componentes celulares que colaboram com o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Ondas de Ca^{2+} fora de estimulação e aumento da ativação da quinase II dependente de Ca^{2+} /calmodulina (CAMKII) (processos de fosforilação e oxidação), eventos que favorecem arritmia, também são inibidos de pelo H β DL. No estresse oxidativo, o H β DL restaura a atividade das enzimas glutatona peroxidase (GPx) e superóxido dismutase mitocondrial (Mn-SOD), além de reduzir a lipoperoxidação e espécies reativas citoplasmáticas e mitocondriais geradas pela NADPH oxidase (NOX). Nas vias apoptóticas, o H β DL reduz a expressão das proteínas pró apoptóticas Bax e Caspase 3. O H β DL também pode interagir com a quinase na cadeia leve de miosina, membro 4 (Myk4) e com a CAMKII, de forma a prevenir eventos que levam à degeneração cardíaca. *In vivo*, o H β DL previne arritmias. Fonte: Durço, A. O. 2023. Criado com BioRender.com.

6.1 Limitações

Conscientes de que todo trabalho apresenta limitações, neste, ao menos 3 (três) podem ser citadas. Uma, refere-se ao fato de todos os modelos experimentais terem sido realizados em animais saudáveis, sem células cancerosas, quando seria mais próximo da prática clínica utilizar animais com câncer. A outra insere-se neste mesmo nicho: o DL possui ação antioxidante, sendo essa uma via trabalhada pelos medicamentos antitumorigênicos. Embora haja base para não acreditar na possibilidade de o HBDL interfira na eficácia antitumoral da Doxo (ASSALI *et al.*, 2022; BRAZ *et al.*, 2020; SHAH *et al.*, 2018; YU *et al.*, 2018), seria mais adequado um protocolo experimental que utilizasse animais com câncer e que, concomitante à administração de quimioterapia e DL, realizasse análise dos estágios de desenvolvimento e acompanhamento tumoral. Por último, embora a proposta do trabalho abranja a vertente preventiva, na prática a maioria dos pacientes com câncer são diagnosticados com a cardiotoxicidade após as lesões já instaladas. Assim, seria interessante observar os efeitos do DL num protocolo de tratamento.

7 Conclusão

O H β DL apresentou um efeito cardioprotetor sobre a cardiotoxicidade induzida por Doxorubicina, sob distintas formas. Destas, vale a pena ressaltar o efeito do H β DL em prevenir as arritmias induzidas pela Doxo, cuja ação inibidora foi observada em diversas vias arritmogênicas, tais como na excitabilidade celular, manejo de Ca²⁺ intracelular, ativação da CaMKII, estresse oxidativo, vias apoptóticas e acoplamento excitação-contração.

Por fim, os estudos *in silico* trouxeram evidências de que o DL potencialmente interage com CaMKII e cMLCK, podendo levar à inibição das suas atividades, supressão das cascatas de eventos danosos aos cardiomiócitos e, em última instância, prevenindo arritmias.

Os achados desse estudo indicam o potencial efeito cardioprotetor do H β DL na cardiotoxicidade induzida por Doxo, ampliando a perspectiva de tratamentos com possível mitigação de efeitos adversos e com ação em múltiplas vias.

Referências

- ABDUL GHANI, M. A.; UGUSMAN, A.; LATIP, J.; ZAINALABIDIN, S. Role of Terpenophenolics in Modulating Inflammation and Apoptosis in Cardiovascular Diseases: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 6, p. 5339, 10 mar. 2023.
- ABUSHOUK, A. I.; ISMAIL, A.; SALEM, A. M. A.; AFIFI, A. M.; ABDEL-DAIM, M. M. Cardioprotective mechanisms of phytochemicals against doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 90, p. 935–946, 1 jun. 2017.
- ADÃO, R.; DE KEULENAER, G.; LEITE-MOREIRA, A.; BRÁS-SILVA, C. Cardiotoxicidade associada à terapêutica oncológica: mecanismos fisiopatológicos e estratégias de prevenção. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, v. 32, n. 5, p. 395–409, 1 maio 2013.
- AHMED, M.; JALILY HASANI, H.; GANESAN, A.; HOUGHTON, M.; BARAKAT, K. Modeling the Human Nav1.5 Sodium Channel: Structural and Mechanistic Insights of Ion Permeation and Drug Blockade. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 11, p. 2301–2324, 2017.
- AKIN, B. L.; HURLEY, T. D.; CHEN, Z.; JONES, L. R. The Structural Basis for Phospholamban Inhibition of the Calcium Pump in Sarcoplasmic Reticulum. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 42, p. 30181–30191, 18 out. 2013.
- AL SHOYAIB, A.; ARCHIE, S. R.; KARAMYAN, V. T. Intraperitoneal Route of Drug Administration: Should It Be Used in Experimental Animal Studies? **Pharmaceutical Research**, v. 37, n. 1, p. 12, 23 dez. 2019.
- ALDRED, E. M.; BUCK, C.; VALL, K. Chapter 22 - Terpenes. *Em*: ALDRED, E. M.; BUCK, C.; VALL, K. **Pharmacology**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2009. p. 167–174.
- ALEXANDER, J.; DAINIAK, N.; BERGER, H. J.; GOLDMAN, L.; JOHNSTONE, D.; REDUTO, L.; DUFFY, T.; SCHWARTZ, P.; GOTTSCHALK, A.; ZARET, B. L. Serial Assessment of Doxorubicin Cardiotoxicity with Quantitative Radionuclide Angiocardiology. **The New England Journal of Medicine**, v. 300, n. 6, p. 278–283, 8 fev. 1979.
- ALEXANDRE, J.; CAUTELA, J.; EDERHY, S.; DAMAJ, G. L.; SALEM, J.; BARLESI, F.; FARNAULT, L.; CHARBONNIER, A.; MIRABEL, M.; CHAMPIAT, S.; COHEN-SOLAL, A.; COHEN, A.; DOLLADILLE, C.; THUNY, F. Cardiovascular Toxicity Related to Cancer Treatment: A Pragmatic Approach to the American and European Cardio-Oncology Guidelines. **Journal of the American Heart Association**, v. 9, n. 18, p. e018403, 15 set. 2020.
- ALGHATRIF, M.; LINDSAY, J. A brief review: history to understand fundamentals of electrocardiography. **Journal of Community Hospital Internal Medicine Perspectives**, v. 2, n. 1, 30 abr. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3714093/>>. Acesso em: 17 nov. 2018.
- AL-KHATIB, S. M.; STEVENSON, W. G.; ACKERMAN, M. J.; BRYANT, W. J.; CALLANS, D. J.; CURTIS, A. B.; DEAL, B. J.; DICKFELD, T.; FIELD, M. E.; FONAROW, G. C.; GILLIS, A. M.; GRANGER, C. B.; HAMMILL, S. C.; HLATKY, M. A.; JOGLAR, J. A.; KAY, G. N.; MATLOCK, D. D.; MYERBURG, R. J.; PAGE, R. L. 2017 AHA/ACC/HRS Guideline for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death. **Circulation**, v. 138, n. 13, p. e272–e391, 25 set. 2018.

- ALKURAISHY, H. M.; AL-GAREEB, A. I.; AL-HUSSANIY, H. A. Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: Molecular Mechanism and Protection by Conventional Drugs and Natural Products. **International Journal of Clinical Oncology and Cancer Research**, v. 2, n. 2, p. 31, 20 mar. 2017.
- ALSAFFAR, R. M.; RASHID, S.; AHMAD, S. B.; REHMAN, M. U.; HUSSAIN, I.; PARVAIZ AHMAD, S.; GANAIE, M. A. D-limonene (5 (one-methyl-four-[1-methylethenyl]) cyclohexane) diminishes CCl₄-induced cardiac toxicity by alleviating oxidative stress, inflammatory and cardiac markers. **Redox Report**, v. 27, n. 1, p. 92–99, 31 dez. 2022.
- ALVES-SILVA, J. M.; ZUZARTE, M.; MARQUES, C.; SALGUEIRO, L.; GIRAO, H. Protective Effects of Terpenes on the Cardiovascular System: Current Advances and Future Perspectives. **Current Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 40, p. 4559–4600, 2016.
- AMIN, A. S.; TAN, H. L.; WILDE, A. A. M. Cardiac Ion Channels in Health and Disease. **Heart Rhythm**, v. 7, n. 1, p. 117–126, 1 jan. 2010.
- ANANDAKUMAR, P.; KAMARAJ, S.; VANITHA, M. K. D-Limonene: A Multifunctional Compound with Potent Therapeutic Effects. **Journal of Food Biochemistry**, v. 45, n. 1, p. e13566, jan. 2021.
- ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. de. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. [s.l.] Editora FIOCRUZ, 2006.
- ANDRADE, T. A.; FREITAS, T. S.; ARAÚJO, F. O.; MENEZES, P. P.; DÓRIA, G. A. A.; RABELO, A. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; SANTOS, M. R. V.; BEZERRA, D. P.; SERAFINI, M. R.; MENEZES, I. R. A.; NUNES, P. S.; ARAÚJO, A. A. S.; COSTA, M. S.; CAMPINA, F. F.; SANTOS, A. T. L.; SILVA, A. R. P.; COUTINHO, H. D. M. Physico-chemical characterization and antibacterial activity of inclusion complexes of Hyptis martiusii Benth essential oil in β -cyclodextrin. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 89, p. 201–207, 1 maio 2017.
- ARAFA, M. H.; MOHAMMAD, N. S.; ATTEIA, H. H.; ABD-ELAZIZ, H. R. Protective Effect of Resveratrol against Doxorubicin-Induced Cardiac Toxicity and Fibrosis in Male Experimental Rats. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 70, n. 3, p. 701–711, set. 2014.
- ARAÚJO-FILHO, H. G.; PEREIRA, E. W. M.; REZENDE, M. M.; MENEZES, P. P.; ARAÚJO, A. A. S.; BARRETO, R. S. S.; MARTINS, A. O. B. P. B.; ALBUQUERQUE, T. R.; SILVA, B. A. F.; ALCANTARA, I. S.; COUTINHO, H. D. M.; MENEZES, I. R. A.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; QUINTANS, J. S. S. D-Limonene Exhibits Superior Antihyperalgesic Effects in a β -Cyclodextrin-Complexed Form in Chronic Musculoskeletal Pain Reducing Fos Protein Expression on Spinal Cord in Mice. **Neuroscience**, v. 358, p. 158–169, 1 set. 2017.
- AVILA, M. S.; SIQUEIRA, S. R. R.; FERREIRA, S. M. A.; BOCCHI, E. A. Prevention and Treatment of Chemotherapy-Induced Cardiotoxicity. **Methodist DeBakey Cardiovascular Journal**, v. 15, n. 4, p. 267–273, 2019.
- BACANLI, M. Chapter 27 - Limonene and ursolic acid in the treatment of diabetes: Citrus phenolic limonene, triterpenoid ursolic acid, antioxidants and diabetes. *Em*: PREEDY, V. R. **Diabetes (Second Edition)**. [s.l.] Academic Press, 2020. p. 275–283.
- BACANLI, M.; ANLAR, H. G.; AYDIN, S.; ÇAL, T.; ARI, N.; ÜNDEĞER BUCURGAT, Ü.; BAŞARAN, A. A.; BAŞARAN, N. D-Limonene Ameliorates Diabetes and Its Complications in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 110, p. 434–442, dez. 2017.

- BACHUR, N. R. Anthracyclines. *Em*: BERTINO, J. R. **Encyclopedia of Cancer (Second Edition)**. New York: Academic Press, 2002. p. 57–61.
- BARRETO, R. S.; LIMA, P. S.; ARAUJO, H. G.; PEREIRA, E. W.; REZENDE, M. M.; GUIMARAES, A. G.; BARRETO, A. S.; SANTOS, M. R.; ARAUJO, A. A.; QUINTANS-JUNIOR, L. J.; QUINTANS, J. S. D-Limonene Complexed with β -Cyclodextrin Reduces Hyperalgesia in a Mice Model for Fibromyalgia. **The FASEB Journal**, v. 31, n. S1, p. 812.5-812.5, 2017.
- BASSANI, J.W.; BASSANI, R.A.; BERS, D. M. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. **The Journal of Physiology**, 15;476(2):279-93, abril1994.
- BASSANI, J. W.; YUAN, W.; BERS, D. M. Fractional SR Ca Release Is Regulated by Trigger Ca and SR Ca Content in Cardiac Myocytes. **The American Journal of Physiology**, v. 268, n. 5 Pt 1, p. C1313-1319, maio 1995.
- BENJANUWATTRA, J.; SIRI-ANGKUL, N.; CHATTIPAKORN, S. C.; CHATTIPAKORN, N. Doxorubicin and Its Proarrhythmic Effects: A Comprehensive Review of the Evidence from Experimental and Clinical Studies. **Pharmacological Research**, v. 151, p. 104542, 1 jan. 2020.
- BERS, D. M. Cardiac Excitation-Contraction Coupling. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 198–205, 10 jan. 2002.
- BERTERO, E.; MAACK, C. Calcium Signaling and Reactive Oxygen Species in Mitochondria. **Circulation Research**, v. 122, n. 10, p. 1460–1478, 11 maio 2018.
- BETANCUR-GALVIS, L.; CHECA, J.; MARCO, J. A.; ESTORNELL, E. Jatrophone Diterpenes from the Latex of Euphorbia Obtusifolia with Inhibitory Activity on the Mammalian Mitochondrial Respiratory Chain. **Planta Medica**, v. 69, n. 2, p. 177–178, fev. 2003a.
- BETANCUR-GALVIS, L.; PALOMARES, E.; MARCO, J. A.; ESTORNELL, E. Tiglane diterpenes from the latex of Euphorbia obtusifolia with inhibitory activity on the mammalian mitochondrial respiratory chain. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, n. 2, p. 279–282, 1 abr. 2003b.
- BEZANILLA, F. Voltage-gated ion channels. **IEEE Transactions on NanoBioscience**, v. 4, n. 1, p. 34–48, mar. 2005.
- BICAS, J. L.; PASTORE, G. M. Isolation and Screening of D-Limonene-Resistant Microorganisms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 563–567, set. 2007.
- BILLINGHAM, M. E.; MASON, J. W.; BRISTOW, M. R.; DANIELS, J. R. Anthracycline Cardiomyopathy Monitored by Morphologic Changes. **Cancer Treatment Reports**, v. 62, n. 6, p. 865–872, jun. 1978.
- BLANCO, A.; BLANCO, G. Chapter 10 - Antioxidants. *Em*: BLANCO, A.; BLANCO, G. **Medical Biochemistry**. [s.l.] Academic Press, 2017. p. 205–214.
- BLANKENBERG, S.; RUPPRECHT, H. J.; BICKEL, C.; TORZEWSKI, M.; HAFNER, G.; TIRET, L.; SMIEJA, M.; CAMBIEN, F.; MEYER, J.; LACKNER, K. J.; ATHEROGENE INVESTIGATORS. Glutathione Peroxidase 1 Activity and Cardiovascular Events in Patients with Coronary Artery Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 17, p. 1605–1613, 23 out. 2003.
- BOHMONT, C.; AARONSON, L. M.; MANN, K.; PARDINI, R. S. Inhibition of Mitochondrial NADH Oxidase, Succinoxidase, and ATPase by Naturally Occurring Flavonoids. **Journal of Natural Products**, v. 50, n. 3, p. 427–433, 1 maio 1987.
- BOOSER, D. J.; HORTOBAGYI, G. N. Anthracycline Antibiotics in Cancer Therapy. Focus on Drug Resistance. **Drugs**, v. 47, n. 2, p. 223–258, fev. 1994.

- BOUNTIOUKOS, M.; DOORDUIJN, J. K.; ROELANDT, J. R. T. C.; VOURVOURI, E. C.; BAX, J. J.; SCHINKEL, A. F. L.; KERTAI, M. D.; SONNEVELD, P.; POLDERMANS, D. Repetitive Dobutamine Stress Echocardiography for the Prediction of Anthracycline Cardiotoxicity. **European Journal of Echocardiography**, v. 4, n. 4, p. 300–305, 1 dez. 2003.
- BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.
- BRESADOLA, M. Medicine and Science in the Life of Luigi Galvani (1737–1798). **Brain Research Bulletin**, v. 46, n. 5, p. 367–380, 15 jul. 1998.
- BRISTOW, M. R.; MASON, J. W.; BILLINGHAM, M. E.; DANIELS, J. R. Doxorubicin Cardiomyopathy: Evaluation by Phonocardiography, Endomyocardial Biopsy, and Cardiac Catheterization. **Annals of Internal Medicine**, v. 88, n. 2, p. 168–175, fev. 1978.
- BRITTO, R. M. de; SILVA-NETO, J. A. da; MESQUITA, T. R. R.; VASCONCELOS, C. M. L. de; DE ALMEIDA, G. K. M.; JESUS, I. C. G. de; SANTOS, P. H. D.; SOUZA, D. S.; MIGUEL-DOS-SANTOS, R.; DE SÁ, L. A.; DOS SANTOS, F. S. M.; PEREIRA-FILHO, R. N.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; GUATIMOSIM, S.; LAUTON-SANTOS, S. Myrtenol Protects against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury through Antioxidant and Anti-Apoptotic Dependent Mechanisms. **Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 111, p. 557–566, jan. 2018.
- BUCKLE, J. Chapter 3 - Basic Plant Taxonomy, Chemistry, Extraction, Biosynthesis, and Analysis. *Em*: BUCKLE, J. **Clinical Aromatherapy (Second Edition)**. Saint Louis: Churchill Livingstone, 2003. p. 38–75.
- BUCKLE, J. Chapter 3 - Basic Plant Taxonomy, Basic Essential Oil Chemistry, Extraction, Biosynthesis, and Analysis. *Em*: BUCKLE, J. **Clinical Aromatherapy (Third Edition)**. St. Louis: Churchill Livingstone, 2015. p. 37–72.
- BUZDAR, A. U.; MARCUS, C.; SMITH, T. L.; BLUMENSCHNIG, G. R. Early and Delayed Clinical Cardiotoxicity of Doxorubicin. **Cancer**, v. 55, n. 12, p. 2761–2765, 15 jun. 1985.
- CAI, F.; LUIS, M. A. F.; LIN, X.; WANG, M.; CAI, L.; CEN, C.; BISKUP, E. Anthracycline-Induced Cardiotoxicity in the Chemotherapy Treatment of Breast Cancer: Preventive Strategies and Treatment. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 11, n. 1, p. 15–23, jul. 2019.
- CAILLET, P.; LIUU, E.; RAYNAUD SIMON, A.; BONNEFOY, M.; GUERIN, O.; BERRUT, G.; LESOURD, B.; JEANDEL, C.; FERRY, M.; ROLLAND, Y.; PAILLAUD, E. Association between Cachexia, Chemotherapy and Outcomes in Older Cancer Patients: A Systematic Review. **Clinical Nutrition**, dez. 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0261561416313449>>. Acesso em: 8 out. 2017.
- CAMPOS, C. A.; LIMA, B. S.; TRINDADE, G. G. G.; SOUZA, E. P. B. S. S.; MOTA, D. S. A.; HEIMFARTH, L.; QUINTANS, J. S. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; SUSSUCHI, E. M.; SARMENTO, V. H. V.; CARVALHO, F. M. S.; MARRETO, R. N.; COSTA, R. M. R.; NUNES, R. S.; ARAÚJO, A. A. S.; SHANMUGAM, S.; THANGARAJ, P. Anti-hyperalgesic and anti-inflammatory effects of citral with β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complexes in animal models. **Life Sciences**, v. 229, p. 139–148, 15 jul. 2019.

- CATTERALL, W. A. Structure and Function of Voltage-Gated Sodium Channels at Atomic Resolution. **Experimental Physiology**, v. 99, n. 1, p. 35–51, 2014.
- CHALLA, R.; AHUJA, A.; ALI, J.; KHAR, R. K. Cyclodextrins in drug delivery: An updated review. **AAPS PharmSciTech**, v. 6, n. 2, p. E329–E357, jun. 2005.
- CHANG, A. N.; MAHAJAN, P.; KNAPP, S.; BARTON, H.; SWEENEY, H. L.; KAMM, K. E.; STULL, J. T. Cardiac myosin light chain is phosphorylated by Ca^{2+} /calmodulin-dependent and -independent kinase activities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 27, p. E3824–E3833, 5 jul. 2016.
- CHATTERJEE, K.; ZHANG, J.; HONBO, N.; KARLINER, J. S. Doxorubicin Cardiomyopathy. **Cardiology**, v. 115, n. 2, p. 155–162, jan. 2010.
- CAVES, L. F.; NEUENSCHWANDER, L. C. Guia Prático para o Oncologista Clínico. São Paulo: SBOC, 2012, 27 p.
- CHEN, Y.; BA, L.; HUANG, W.; LIU, Y.; PAN, H.; MINGYAO, E.; SHI, P.; WANG, Y.; LI, S.; QI, H.; SUN, H.; CAO, Y. Role of carvedilol in cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats through activation of MAPK/ERK and Akt/eNOS signaling pathways. **European Journal of Pharmacology**, v. 796, p. 90–100, 5 fev. 2017.
- CHENG, H.; LEDERER, W. J. Calcium Sparks. **Physiological Reviews**, v. 88, n. 4, p. 1491–1545, out. 2008.
- CHO, K. S.; LIM, Y.; LEE, K.; LEE, J.; LEE, J. H.; LEE, I.-S. Terpenes from Forests and Human Health. **Toxicological Research**, v. 33, n. 2, p. 97–106, abr. 2017.
- CHOE, S. Potassium Channel Structures. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, n. 2, p. 115, fev. 2002.
- CHOI, E. H.; LEE, N.; KIM, H. J.; KIM, M. K.; CHI, S.-G.; KWON, D. Y.; CHUN, H. S. Schisandra Fructus Extract Ameliorates Doxorubicin-Induce Cytotoxicity in Cardiomyocytes: Altered Gene Expression for Detoxification Enzymes. **Genes & Nutrition**, v. 2, n. 4, p. 337–345, fev. 2008a.
- CHOI, H. J.; SEON, M. R.; LIM, S. S.; KIM, J.-S.; CHUN, H. S.; PARK, J. H. Y. Hexane/Ethanol Extract of Glycyrrhiza Uralensis Licorice Suppresses Doxorubicin-Induced Apoptosis in H9c2 Rat Cardiac Myoblasts. **Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)**, v. 233, n. 12, p. 1554–1560, dez. 2008b.
- CHRISTIDI, E.; BRUNHAM, L. R. Regulated cell death pathways in doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Cell Death & Disease**, v. 12, n. 4, p. 339, 1 abr. 2021.
- ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2021 Feb 15. Identifier NCT04392622, **A Phase 1 Study of d Limonene With Concurrent Radiation and Platinum Based Chemotherapy for Xerostomia Prevention in Locally Advanced Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC)**; 2023 Aug 15 [cited 2023 Apr 12]; [about 4 screens]. Available from: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04392622>>. Acesso em: 12 abr. 2023.
- COTTIN, Y.; L'HUILLIER, I.; CASASNOVAS, O.; GEOFFROY, C.; CAILLOT, D.; ZELLER, M.; SOLARY, E.; GUY, H.; WOLF, J.-E. Dobutamine Stress Echocardiography Identifies Anthracycline Cardiotoxicity. **European Journal of Echocardiography**, v. 1, n. 3, p. 180–183, 1 set. 2000.
- COVE-SMITH, L.; WOODHOUSE, N.; HARGREAVES, A.; KIRK, J.; SMITH, S.; PRICE, S. A.; GALVIN, M.; BETTS, C. J.; BROCKLEHURST, S.; BACKEN, A.; RADFORD, J.; LINTON, K.; ROBERTS, R. A.; SCHMITT, M.; DIVE, C.; TUGWOOD, J. D.; HOCKINGS, P. D.; MELLOR, H. R. An Integrated Characterization of Serological, Pathological, and Functional Events in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. **Toxicological Sciences**, v. 140, n. 1, p. 3–15, 1 jul. 2014.

- COX-GEORGIAN, D.; RAMADOSS, N.; DONA, C.; BASU, C. Therapeutic and Medicinal Uses of Terpenes. **Medicinal Plants**, p. 333–359, 12 nov. 2019.
- CROWELL, P. L.; ELSON, C. E.; BAILEY, H. H.; ELEGBEDE, A.; HAAG, J. D.; GOULD, M. N. Human Metabolism of the Experimental Cancer Therapeutic Agent D-Limonene. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 35, n. 1, p. 31–37, 1994.
- CROWELL, P. L.; LIN, S.; VEDEJS, E.; GOULD, M. N. Identification of Metabolites of the Antitumor Agent D-Limonene Capable of Inhibiting Protein Isoprenylation and Cell Growth. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 31, n. 3, p. 205–212, 1992.
- CURIGLIANO, G.; CARDINALE, D.; DENT, S.; CRISCITIELLO, C.; ASEYEV, O.; LENIHAN, D.; CIPOLLA, C. M. Cardiotoxicity of Anticancer Treatments: Epidemiology, Detection, and Management. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 66, n. 4, p. 309–325, 2016.
- CURIGLIANO, G.; LENIHAN, D.; FRADLEY, M.; GANATRA, S.; BARAC, A.; BLAES, A.; HERRMANN, J.; PORTER, C.; LYON, A. R.; LANCELLOTTI, P.; PATEL, A.; DECARA, J.; MITCHELL, J.; HARRISON, E.; MOSLEHI, J.; WITTELES, R.; CALABRO, M. G.; ORECCHIA, R.; DE AZAMBUJA, E.; ZAMORANO, J. L.; KRONE, R.; IAKOBISHVILI, Z.; CARVER, J.; ARMENIAN, S.; KY, B.; CARDINALE, D.; CIPOLLA, C. M.; DENT, S.; JORDAN, K. Management of Cardiac Disease in Cancer Patients throughout Oncological Treatment: ESMO Consensus Recommendations. **Annals of Oncology**, v. 31, n. 2, p. 171–190, 1 fev. 2020.
- DAVIDOFF, A. W.; BOYDEN, P. A.; SCHWARTZ, K.; MICHEL, J. B.; ZHANG, Y. M.; OBAYASHI, M.; CRABBE, D.; TER KEURS, H. E. D. J. Congestive Heart Failure after Myocardial Infarction in the Rat: Cardiac Force and Spontaneous Sarcomere Activity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1015, n. 1, p. 84–95, 2004.
- DE CERQUEIRA, S. V. S.; GONDIM, A. N. S.; ROMAN-CAMPOS, D.; CRUZ, J. S.; PASSOS, A. G. da S.; LAUTON-SANTOS, S.; LARA, A.; GUATIMOSIM, S.; CONDE-GARCIA, E. A.; DE OLIVEIRA, E. D.; DE VASCONCELOS, C. M. L. R(+)-pulegone impairs Ca²⁺ homeostasis and causes negative inotropism in mammalian myocardium. **European Journal of Pharmacology**, v. 672, n. 1, p. 135–142, 15 dez. 2011.
- DE MENEZES-FILHO, J. E. R.; GONDIM, A. N. S.; CRUZ, J. S.; DE SOUZA, A. A.; SANTOS, J. N. A. D.; CONDE-GARCIA, E. A.; DE SOUSA, D. P.; SANTOS, M. S.; DE OLIVEIRA, E. D.; DE VASCONCELOS, C. M. L. Geraniol Blocks Calcium and Potassium Channels in the Mammalian Myocardium: Useful Effects to Treat Arrhythmias. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 115, n. 6, p. 534–544, dez. 2014.
- Definition of cumulative dose - NCI Dictionary of Cancer Terms - NCI.**
nciAppModulePage. Disponível em:
<<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/cumulative-dose>>.
Acesso em: 9 maio. 2023.
- DEL PRADO-AUDELO, M. L.; CORTÉS, H.; CABALLERO-FLORÁN, I. H.; GONZÁLEZ-TORRES, M.; ESCUTIA-GUADARRAMA, L.; BERNAL-CHÁVEZ, S. A.; GIRALDO-GOMEZ, D. M.; MAGAÑA, J. J.; LEYVA-GÓMEZ, G. Therapeutic Applications of Terpenes on Inflammatory Diseases. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, 2021. Disponível em:
<<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2021.704197>>. Acesso em: 22 mar. 2023.

- DIFRANCESCO DARIO. The Role of the Funny Current in Pacemaker Activity. **Circulation Research**, v. 106, n. 3, p. 434–446, 19 fev. 2010.
- DOUEDI, S.; CARSON, M. P. Anthracycline Medications (Doxorubicin). *Em: StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.
- DUAN, D. D. Phenomics of Cardiac Chloride Channels. **Comprehensive Physiology**, v. 3, n. 2, p. 667–692, abr. 2013.
- DULF, P. L.; MOCAN, M.; COADĂ, C. A.; DULF, D. V.; MOLDOVAN, R.; BALDEA, I.; FARCAS, A.-D.; BLENDEA, D.; FILIP, A. G. Doxorubicin-Induced Acute Cardiotoxicity Is Associated with Increased Oxidative Stress, Autophagy, and Inflammation in a Murine Model. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 396, n. 6, p. 1105–1115, 1 jun. 2023.
- DURÇO, A. O.; CONCEIÇÃO, L. S. R.; DE SOUZA, D. S.; LIMA, C. A.; QUINTANS, J. de S. S.; VIANA DOS SANTOS, M. R. Perillyl Alcohol as a Treatment for Cancer: A Systematic Review. **Phytomedicine Plus**, v. 1, n. 3, p. 100090, 1 ago. 2021.
- DURÇO, A. O.; DE SOUZA, D. S.; HEIMFARTH, L.; MIGUEL-DOS-SANTOS, R.; RABELO, T. K.; OLIVEIRA BARRETO, T. de; RHANA, P.; SANTOS SANTANA, M. N.; BRAGA, W. F.; SANTOS CRUZ, J. dos; LAUTON-SANTOS, S.; SANTANA-FILHO, V. J. de; BARRETO, R. de S. S.; GUIMARÃES, A. G.; ALVAREZ-LEITE, J. I.; QUINTANS JÚNIOR, L. J.; VASCONCELOS, C. M. L. de; SANTOS, M. R. V. dos; BARRETO, A. S. d-Limonene Ameliorates Myocardial Infarction Injury by Reducing Reactive Oxygen Species and Cell Apoptosis in a Murine Model. **Journal of Natural Products**, v. 82, n. 11, p. 3010–3019, 22 nov. 2019.
- EISNER, D. A.; CALDWELL, J. L.; KISTAMÁS, K.; TRAFFORD, A. W. Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. **Circulation Research**, v. 121, n. 2, p. 181–195, 7 jul. 2017.
- FALK FILIPSSON, A.; BARD, J.; KARLSSON, S. **Limonene**. Geneva: World Health Organization, 1998. 32 p.
- FAO. 2021. Citrus Fruit Statistical Compendium 2020. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Rome. Disponível em: <http://www.fao.org/3/cb6492en/cb6492en.pdf>
- FERNANDEZ-RUOCCO, J.; GALLEGGO, M.; RODRIGUEZ-DE-YURRE, A.; ZAYAS-ARRABAL, J.; ECHEAZARRA, L.; ALQUIZA, A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, V.; RODRIGUEZ-ROBLEDO, J. M.; BRITO, O.; SCHLEIER, Y.; SEPULVEDA, M.; OSHIYAMA, N. F.; VILA-PETROFF, M.; BASSANI, R. A.; MEDEI, E. H.; CASIS, O. High Thyrotropin Is Critical for Cardiac Electrical Remodeling and Arrhythmia Vulnerability in Hypothyroidism. **Thyroid**, v. 29, n. 7, p. 934–945, jul. 2019.
- FRADLEY, M. G.; BECKIE, T. M.; BROWN, S. A.; CHENG, R. K.; DENT, S. F.; NOHRIA, A.; PATTON, K. K.; SINGH, J. P.; OLSHANSKY, B.; NULL, null. Recognition, Prevention, and Management of Arrhythmias and Autonomic Disorders in Cardio-Oncology: A Scientific Statement From the American Heart Association. **Circulation**, v. 144, n. 3, p. e41–e55, 20 jul. 2021.
- FREDERICK, C. A.; WILLIAMS, L. D.; UGHETTO, G.; VAN DER MAREL, G. A.; VAN BOOM, J. H.; RICH, A.; WANG, A. H. J. Structural comparison of anticancer drug-DNA complexes: adriamycin and daunomycin. **Biochemistry**, v. 29, n. 10, p. 2538–2549, 1 mar. 1990.
- FU, H. Y.; SANADA, S.; MATSUZAKI, T.; LIAO, Y.; OKUDA, K.; YAMATO, M.; TSUCHIDA, S.; ARAKI, R.; ASANO, Y.; ASANUMA, H.; ASAKURA, M.; FRENCH, B. A.; SAKATA, Y.; KITAKAZE, M.; MINAMINO, T. Chemical Endoplasmic Reticulum Chaperone Alleviates Doxorubicin-Induced Cardiac Dysfunction. **Circulation Research**, v. 118, n. 5, p. 798–809, 4 mar. 2016.

- FURLANETTO, J.; EIERMANN, W.; MARMÉ, F.; REIMER, T.; REINISCH, M.; SCHMATLOCH, S.; STICKELER, E.; THOMSEN, C.; UNTCH, M.; DENKERT, C.; VON MINCKWITZ, G.; LEDERER, B.; NEKLJUDOVA, V.; WEBER, K.; LOIBL, S.; MÖBUS, V. Higher Rate of Severe Toxicities in Obese Patients Receiving Dose-Dense (Dd) Chemotherapy According to Unadjusted Body Surface Area: Results of the Prospectively Randomized GAIN Study. **Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 27, n. 11, p. 2053–2059, nov. 2016.
- GHIGO, A.; LI, M.; HIRSCH, E. New Signal Transduction Paradigms in Anthracycline-Induced Cardiotoxicity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, Cardiomyocyte Biology: Integration of Developmental and Environmental Cues in the Heart. v. 1863, n. 7, Part B, p. 1916–1925, 1 jul. 2016.
- GORDAN, R.; FEFELOVA, N.; GWATHMEY, J. K.; XIE, L.-H. Iron Overload, Oxidative Stress and Calcium Mishandling in Cardiomyocytes: Role of the Mitochondrial Permeability Transition Pore. **Antioxidants**, v. 9, n. 8, p. 758, ago. 2020.
- GORINI, S.; DE ANGELIS, A.; BERRINO, L.; MALARA, N.; ROSANO, G.; FERRARO, E. Chemotherapeutic Drugs and Mitochondrial Dysfunction: Focus on Doxorubicin, Trastuzumab, and Sunitinib. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 7582730, 18 mar. 2018.
- GUYTON, A.C. e HALL, J.E.— Tratado de Fisiologia Médica. Editora Elsevier. **13ª ed.**, 2017.
- HAJJAR, L. A.; DA COSTA, I. B. S. da S.; LOPES, M. A. C. Q.; HOFF, P. M. G.; DIZ, M. D. P. E.; FONSECA, S. M. R.; BITTAR, C. S.; REHDER, M. H. H. dos S.; RIZK, S. I.; ALMEIDA, D. R.; FERNANDES, G. dos S.; BECK-DA-SILVA, L.; CAMPOS, C. A. H. de M.; MONTERA, M. W.; ALVES, S. M. M.; FUKUSHIMA, J. T.; DOS SANTOS, M. V. C.; NEGRÃO, C. E.; DA SILVA, T. L. F.; FERREIRA, S. M. A.; MALACHIAS, M. V. B.; MOREIRA, M. da C. V.; VALENTE, M. M. R.; FONSECA, V. C. Q.; SOEIRO, M. C. F. de A.; ALVES, J. B. S.; SILVA, C. M. P. D. C.; SBANO, J.; PAVANELLO, R.; PINTO, I. M. F.; SIMÃO, A. F.; DRACOUAKIS, M. D. A.; HOFF, A. O.; ASSUNÇÃO, B. M. B. L.; NOVIS, Y.; TESTA, L.; DE ALENCAR, A. C.; CRUZ, C. B. B. V.; PEREIRA, J.; GARCIA, D. R.; NOMURA, C. H.; ROCHITTE, C. E.; MACEDO, A. V. S.; MARCATTI, P. T. F.; MATHIAS, W.; WIERMANN, E. G.; DO VAL, R.; FREITAS, H.; COUTINHO, A.; MATHIAS, C. M. de C.; VIEIRA, F. M. de A. C.; SASSE, A. D.; ROCHA, V.; RAMIRES, J. A. F.; KALIL, R. Diretriz Brasileira de Cardio-oncologia – 2020. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 115, n. 5, p. 1006–1043, 1 nov. 2020.
- HALLIWELL, B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 312–322, jun. 2006.
- HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring Reactive Species and Oxidative Damage in Vivo and in Cell Culture: How Should You Do It and What Do the Results Mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231–255, maio 2004.
- HAMZA, A. A.; AHMED, M. M.; ELWEY, H. M.; AMIN, A. Melissa officinalis Protects against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Rats and Potentiates Its Anticancer Activity on MCF-7 Cells. **Plos One**, 11(11):e0167049.doi:10.1371/journal.pone.0167049, nov 2016.
- HAN, Y.; SUN, Z.; CHEN, W. Antimicrobial Susceptibility and Antibacterial Mechanism of Limonene against *Listeria Monocytogenes*. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 33, jan. 2020.

- HAZARI, M. S.; HAYKAL-COATES, N.; WINSETT, D. W.; COSTA, D. L.; FARRAJ, A. K. Continuous Electrocardiogram Reveals Differences in the Short-Term Cardiotoxic Response of Wistar-Kyoto and Spontaneously Hypertensive Rats to Doxorubicin. **Toxicological Sciences**, v. 110, n. 1, p. 224–234, 1 jul. 2009.
- HENDERSON, K. A.; BORDERS, R. B.; ROSS, J. B.; ABDULALIL, A.; GIBBS, S.; SKOWRONEK, A. J.; KNOTSMAN, K.; BAILEY, J.; SMITH, J.; VINCI, T.; WOOD, B.; KNOPP, M. V.; ROCHE, B. M. Integration of Cardiac Energetics, Function and Histology from Isolated Rat Hearts Perfused with Doxorubicin and Doxorubicin-Ol; a Model for Use in Drug Safety Evaluations. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 94, p. 54–63, 1 nov. 2018.
- HEUSCH, P.; CANTON, M.; AKER, S.; VAN DE SAND, A.; KONIETZKA, I.; RASSAF, T.; MENAZZA, S.; BRODDE, O.; DI LISA, F.; HEUSCH, G.; SCHULZ, R. The contribution of reactive oxygen species and p38 mitogen-activated protein kinase to myofilament oxidation and progression of heart failure in rabbits. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, n. 6, p. 1408–1416, jul. 2010.
- HOANG-TRONG, T. M.; ULLAH, A.; JAFRI, M. S. Calcium Sparks in the Heart: Dynamics and Regulation. **Research and reports in biology**, v. 6, p. 203–214, 2015.
- HODNICK, W. F.; BOHMONT, C. W.; CAPPS, C.; PARDINI, R. S. Inhibition of the Mitochondrial NADH-Oxidase (NADH-Coenzyme Q Oxido-Reductase) Enzyme System by Flavonoids: A Structure-Activity Study. **Biochemical Pharmacology**, v. 36, n. 17, p. 2873–2874, 1 set. 1987.
- HODNICK, W. F.; DUVAL, D. L.; PARDINI, R. S. Inhibition of mitochondrial respiration and cyanide-stimulated generation of reactive oxygen species by selected flavonoids. **Biochemical Pharmacology**, v. 47, n. 3, p. 573–580, 9 fev. 1994.
- HORVÁTH, B.; HÉZSŐ, T.; KISS, D.; KISTAMÁS, K.; MAGYAR, J.; NÁNÁSI, P. P.; BÁNYÁSZ, T. Late Sodium Current Inhibitors as Potential Antiarrhythmic Agents. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 413, 20 abr. 2020.
- HRELIA, S.; FIORENTINI, D.; MARALDI, T.; ANGELONI, C.; BORDONI, A.; BIAGI, P. L.; HAKIM, G. Doxorubicin Induces Early Lipid Peroxidation Associated with Changes in Glucose Transport in Cultured Cardiomyocytes. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1567, n. 1–2, p. 150–156, 23 dez. 2002.
- IKEDA, S.; MATSUSHIMA, S.; OKABE, K.; IKEDA, M.; ISHIKITA, A.; TADOKORO, T.; ENZAN, N.; YAMAMOTO, T.; SADA, M.; DEGUCHI, H.; MORIMOTO, S.; IDE, T.; TSUTSUI, H. Blockade of L-Type Ca²⁺ Channel Attenuates Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy via Suppression of CaMKII-NF-κB Pathway. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 9850, 8 jul. 2019.
- IYER, V.; ROMAN-CAMPOS, D.; SAMPSON, K. J.; KANG, G.; FISHMAN, G. I.; KASS, R. S. Purkinje Cells as Sources of Arrhythmias in Long QT Syndrome Type 3. **Scientific Reports**, v. 5, p. 13287, 20 ago. 2015.
- JIANG, J.; MOHAN, N.; ENDO, Y.; SHEN, Y.; WU, W. J. Type IIB DNA topoisomerase is downregulated by trastuzumab and doxorubicin to synergize cardiotoxicity. **Oncotarget**, v. 9, n. 5, p. 6095–6108, 21 dez. 2017.
- JIN, L.; SUN, S.; RYU, Y.; PIAO, Z. H.; LIU, B.; CHOI, S. Y.; KIM, G. R.; KIM, H.-S.; KEE, H. J.; JEONG, M. H. Gallic Acid Improves Cardiac Dysfunction and Fibrosis in Pressure Overload-Induced Heart Failure. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 9302, 18 jun. 2018.
- KAESTNER, S. A.; SEWELL, G. J. Chemotherapy Dosing Part I: Scientific Basis for Current Practice and Use of Body Surface Area. **Clinical Oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))**, v. 19, n. 1, p. 23–37, fev. 2007.

- KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of the mechanism of doxorubicin-induced cardiotoxicity: Have we been barking up the wrong tree? **Redox Biology**, v. 29, p. 101394, 26 nov. 2019.
- KATHURIA, S. V.; CHAN, Y. H.; NOBREGA, R. P.; ÖZEN, A.; MATTHEWS, C. R. Clusters of Isoleucine, Leucine, and Valine Side Chains Define Cores of Stability in High-Energy States of Globular Proteins: Sequence Determinants of Structure and Stability. **Protein Science**, v. 25, n. 3, p. 662–675, 2016.
- KEEPERS, B.; LIU, J.; QIAN, L. What's in a cardiomyocyte – And how do we make one through reprogramming? **Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research**, v. 1867, n. 3, p. 118464, mar. 2020.
- KIANI, J.; AGARWAL, S. K.; KAMIREDDY, S.; ADELSTEIN, E.; SABA, S. Relationship of Electro-Mechanical Remodeling to Survival Rates after Cardiac Resynchronization Therapy. **Texas Heart Institute Journal**, v. 40, n. 3, p. 268–273, 2013.
- KILKENNY, C.; BROWNE, W. J.; CUTHILL, I. C.; EMERSON, M.; ALTMAN, D. G. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. **PLOS Biology**, v. 8, n. 6, p. e1000412, 29 jun. 2010.
- KIM, Y. W.; KIM, M. J.; CHUNG, B. Y.; BANG, D. Y.; LIM, S. K.; CHOI, S. M.; LIM, D. S.; CHO, M. C.; YOON, K.; KIM, H. S.; KIM, K. B.; KIM, Y. S.; KWACK, S. J.; LEE, B.-M. Safety Evaluation And Risk Assessment Of d-Limonene. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 16, n. 1, p. 17–38, 1 jan. 2013.
- KINOSHITA, T.; YUZAWA, H.; NATORI, K.; WADA, R.; YAO, S.; YANO, K.; AKITSU, K.; KOIKE, H.; SHINOHARA, M.; FUJINO, T.; SHIMADA, H.; IKEDA, T. Early Electrocardiographic Indices for Predicting Chronic Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. **Journal of Cardiology**, v. 77, n. 4, p. 388–394, 1 abr. 2021.
- KOLB, P.; FERREIRA, R. S.; IRWIN, J. J.; SHOICHET, B. K. Docking and chemoinformatic screens for new ligands and targets. **Current Opinion in Biotechnology**, Protein technologies / Systems and synthetic biology. v. 20, n. 4, p. 429–436, 1 ago. 2009.
- KONG, L.; ZHANG, Y.; NING, J.; XU, C.; WANG, Z.; YANG, J.; YANG, L. CaMKII Orchestrates Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity by Regulating the IRE1 α /XBP1s Pathway. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 26, n. 20, p. 5303–5314, 2022.
- KOSS-MIKOŁAJCZYK, I.; TODOROVIC, V.; SOBAJIC, S.; MAHAJNA, J.; GERIĆ, M.; TUR, J. A.; BARTOSZEK, A. Natural Products Counteracting Cardiotoxicity during Cancer Chemotherapy: The Special Case of Doxorubicin, a Comprehensive Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 18, p. 10037, jan. 2021.
- KOUTSOUKIS, A.; NTALIANIS, A.; REPASOS, E.; KASTRITIS, E.; DIMOPOULOS, M.-A.; PARASKEVAIDIS, I. Cardio-oncology: A Focus on Cardiotoxicity. **European Cardiology Review**, v. 13, n. 1, p. 64–69, ago. 2018.
- KRISHNAN, P.; VELLI, S.; SALAM, S.; MURUGAN, M.; SUNDARAM, J.; THIRUVENGADAM, D. Protective Effect of D-Limonene Experimentally Induced Cardiotoxicity in Wistar Albino Rats. **International Journal of Scientific Research in Science and Technology**, 2017. Disponível em: <<https://www.semanticscholar.org/paper/Protective-Effect-of-d-Limonene-Experimentally-in-Krishnan-Velli/f7da6e1fd38be9c29ffd5d66b712c295c79cfad2>>. Acesso em: 13 jan. 2024.
- LANDSTROM, A. P.; DOBREV, D.; WEHRENS, X. H. T. Calcium Signaling and Cardiac Arrhythmias. **Circulation Research**, v. 120, n. 12, p. 1969–1993, 9 jun. 2017.

- LI, C.; LIU, Z.; TIAN, J.; LI, G.; JIANG, W.; ZHANG, G.; CHEN, F.; LIN, P.; YE, Z. Protective roles of Asperosaponin VI, a triterpene saponin isolated from *Dipsacus asper* Wall on acute myocardial infarction in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 627, n. 1, p. 235–241, 10 fev. 2010.
- LI, R.; JIA, Z.; TRUSH, M. A. Defining ROS in Biology and Medicine. **Reactive oxygen species (Apex, N.C.)**, v. 1, n. 1, p. 9–21, 2016.
- LI, W.; CAO, J.; WANG, X.; ZHANG, Y.; SUN, Q.; JIANG, Y.; YAO, J.; LI, C.; WANG, Y.; WANG, W. Ferruginol Restores SIRT1-PGC-1 α -Mediated Mitochondrial Biogenesis and Fatty Acid Oxidation for the Treatment of DOX-Induced Cardiotoxicity. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2021.773834>>. Acesso em: 13 jan. 2024.
- LIANG, D.; XUE, Z.; XUE, J.; XIE, D.; XIONG, K.; ZHOU, H.; ZHANG, F.; SU, X.; WANG, G.; ZOU, Q.; LIU, Y.; YANG, J.; MA, H.; PENG, L.; ZENG, C.; LI, G.; WANG, L.; CHEN, Y.-H. Sinoatrial node pacemaker cells share dominant biological properties with glutamatergic neurons. **Protein & Cell**, v. 12, n. 7, p. 545–556, jul. 2021.
- LIMA, B. dos S.; CAMPOS, C. de A.; DA SILVA SANTOS, A. C. R.; SANTOS, V. C. N.; TRINDADE, G. das G. G.; SHANMUGAM, S.; PEREIRA, E. W. M.; MARRETO, R. N.; DUARTE, M. C.; ALMEIDA, J. R. G. da S.; QUINTANS, J. de S. S.; QUINTANS, L. J.; ARAÚJO, A. A. de S. Development of morin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex: Enhancement of bioavailability, antihyperalgesic and anti-inflammatory effects. **Food and Chemical Toxicology**, v. 126, p. 15–24, 1 abr. 2019.
- LIU B.; BAI Q.-X.; CHEN X.-Q.; GAO G.-X.; GU H.-T. Effect of curcumin on expression of survivin, Bcl-2 and Bax in human multiple myeloma cell line. **Journal of Experimental Hematology**, p. 762–766, 2007.
- LIU, B.; ZHU, X.; ZENG, J.; ZHAO, J. Preparation and physicochemical characterization of the supramolecular inclusion complex of naringin dihydrochalcone and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 691–696, 1 nov. 2013.
- LIU, W.; YANG, W.; NIU, R.; CONG, L.; JIANG, M.; BAI, G. Costunolide covalently targets and inhibits CaMKII phosphorylation to reduce ischemia-associated brain damage. **Phytomedicine**, v. 115, p. 154822, 1 jul. 2023.
- LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins: Basic Science and Product Development. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, n. 11, p. 1607–1621, nov. 2010.
- LOFTSSON, T.; MASSON, M. Cyclodextrins in Topical Drug Formulations: Theory and Practice. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 225, n. 1–2, p. 15–30, 28 ago. 2001.
- LOWRY, Oliver H.; ROSEBROUGH, Nira J.; FARR, A. L.; RANDALL, Rose J. Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, nov. 1951.
- LU, M.; MERALI, S.; GORDON, R.; JIANG, J.; LI, Y.; MANDELI, J.; DUAN, X.; FALLON, J.; HOLLAND, J. F. Prevention of Doxorubicin Cardiopathic Changes by a Benzyl Styryl Sulfone in Mice. **Genes & Cancer**, v. 2, n. 10, p. 985–992, out. 2011.
- LUCZAK, E. D.; ANDERSON, M. E. CaMKII Oxidative Activation and the Pathogenesis of Cardiac Disease. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 73, p. 112–116, ago. 2014.
- LUSHCHAK, V. I. Free Radicals, Reactive Oxygen Species, Oxidative Stress and Its Classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164–175, 5 dez. 2014.

LYON, A. R.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, T.; COUCH, L. S.; ASTEGGIANO, R.; AZNAR, M. C.; BERGLER-KLEIN, J.; BORIANI, G.; CARDINALE, D.; CORDOBA, R.; COSYNS, B.; CUTTER, D. J.; DE AZAMBUJA, E.; DE BOER, R. A.; DENT, S. F.; FARMAKIS, D.; GEVAERT, S. A.; GOROG, D. A.; HERRMANN, J.; LENIHAN, D.; MOSLEHI, J.; MOURA, B.; SALINGER, S. S.; STEPHENS, R.; SUTER, T. M.; SZMIT, S.; TAMARGO, J.; THAVENDIRANATHAN, P.; TOCCHETTI, C. G.; VAN DER MEER, P.; VAN DER PAL, H. J. H.; ESC SCIENTIFIC DOCUMENT GROUP; LANCELLOTTI, P.; THUNY, F.; ABDELHAMID, M.; ABOYANS, V.; ALEMAN, B.; ALEXANDRE, J.; BARAC, A.; BORGER, M. A.; CASADO-ARROYO, R.; CAUTELA, J.; ČELUTKIENĖ, J.; CIKES, M.; COHEN-SOLAL, A.; DHIMAN, K.; EDERHY, S.; EDVARDSEN, T.; FAUCHIER, L.; FRADLEY, M.; GRAPSA, J.; HALVORSEN, S.; HEUSER, M.; HUMBERT, M.; JAARSMA, T.; KAHAN, T.; KONRADI, A.; KOSKINAS, K. C.; KOTECHEA, D.; KY, B.; LANDMESSER, U.; LEWIS, B. S.; LINHART, A.; LIP, G. Y. H.; LØCHEN, M.-L.; MALACZYNSKA-RAJPOLD, K.; METRA, M.; MINDHAM, R.; MOONEN, M.; NEILAN, T. G.; NIELSEN, J. C.; PETRONIO, A.-S.; PRESCOTT, E.; RAKISHEVA, A.; SALEM, J.-E.; SAVARESE, G.; SITGES, M.; TEN BERG, J.; TOUYZ, R. M.; TYCINSKA, A.; WILHELM, M.; ZAMORANO, J. L. 2022 ESC Guidelines on Cardio-Oncology Developed in Collaboration with the European Hematology Association (EHA), the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology (ESTRO) and the International Cardio-Oncology Society (IC-OS). **European Heart Journal**, v. 43, n. 41, p. 4229–4361, 1 nov. 2022.

M KAMEL, M.; EL FAROUK, L. O.; SAYED OSMAN, A.; ANWAR KHORSHID, O.; SHABRAWY ABDO, M. E. Comparative Study of the Protective Effect of Metformin and Sitagliptin against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Rats. **Clinical Pharmacology & Biopharmaceutics**, v. 06, n. 03, 2017. Disponível em: <<https://www.omicsonline.org/open-access/comparative-study-of-the-protective-effect-of-metformin-and-sitagliptinagainst-doxorubicininduced-cardiotoxicity-in-rats-2167-065X-1000174.php?aid=93734>>. Acesso em: 20 abr. 2023.

MA, Y.; YANG, L.; MA, J.; LU, L.; WANG, X.; REN, J.; YANG, J. Rutin Attenuates Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity via Regulating Autophagy and Apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1863, n. 8, p. 1904–1911, ago. 2017.

MALAGUETA-VIEIRA, L.; FERNÁNDEZ-RUOCCO, J.; HORTIGÓN-VINAGRE, M. P.; ZAMORA, V.; ZAYAS-ARRABAL, J.; ECHEAZARRA, L.; SMITH, G. L.; VILA PETROFF, M.; MEDEI, E.; CASIS, Ó.; GALLEGU, M. Metformin Reduces Potassium Currents and Prolongs Repolarization in Non-Diabetic Heart. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 11, p. 6021, 27 maio 2022.

MANTAWY, E. M.; EL-BAKLY, W. M.; ESMAT, A.; BADR, A. M.; EL-DEMERDASH, E. Chrysin Alleviates Acute Doxorubicin Cardiotoxicity in Rats via Suppression of Oxidative Stress, Inflammation and Apoptosis. **European Journal of Pharmacology**, v. 728, p. 107–118, 5 abr. 2014.

MARINHO, Y. Y. M.; P. SILVA, E. A.; OLIVEIRA, J. Y. S.; SANTOS, D. M.; LIMA, B. S.; SOUZA, D. S.; MACEDO, F. N.; SANTOS, A. C. R. S.; ARAUJO, A. A. S.; VASCONCELOS, C. M. L.; SANTOS, L. A. B. O.; BATISTA, M. V. A.; QUINTANS, J. S. S.; QUINTANS-JUNIOR, L. J.; DE SANTANA-FILHO, V. J.; BARRETO, A. S.; SANTOS, M. R. V. Preparation, Physicochemical Characterization, Docking and Antiarrhythmic Effect of d-Limonene and d-Limonene Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Complex. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 71, p. 103350, 1 maio 2022.

- MATTIAZZI, A.; KRANIAS, E. G. The role of CaMKII regulation of phospholamban activity in heart disease. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, p. 5, 27 jan. 2014.
- MAYADEVI, M.; SHERIN, D. R.; KEERTHI, V. S.; RAJASEKHARAN, K. N.; OMKUMAR, R. V. Curcumin Is an Inhibitor of Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase II. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 20, p. 6040–6047, 15 out. 2012.
- MITRY, M. A.; LAURENT, D.; KEITH, B. L.; SIRA, E.; EISENBERG, C. A.; EISENBERG, L. M.; JOSHI, S.; GUPTA, S.; EDWARDS, J. G. Accelerated cardiomyocyte senescence contributes to late-onset doxorubicin-induced cardiotoxicity. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 318, n. 2, p. C380–C391, fev. 2020.
- MONNERAT, G.; ALARCÓN, M. L.; VASCONCELLOS, L. R.; HOCHMAN-MENDEZ, C.; BRASIL, G.; BASSANI, R. A.; CASIS, O.; MALAN, D.; TRAVASSOS, L. H.; SEPÚLVEDA, M.; BURGOS, J. I.; VILA-PETROFF, M.; DUTRA, F. F.; BOZZA, M. T.; PAIVA, C. N.; CARVALHO, A. B.; BONOMO, A.; FLEISCHMANN, B. K.; CARVALHO, A. C. C. de; MEDEI, E. Macrophage-Dependent IL-1 β Production Induces Cardiac Arrhythmias in Diabetic Mice. **Nature Communications**, v. 7, p. 13344, 24 nov. 2016.
- MORIS, D.; SPARTALIS, M.; SPARTALIS, E.; KARACHALIOU, G.-S.; KARAOLANIS, G. I.; TSOUROUFLIS, G.; TSILIMIGRAS, D. I.; TZATZAKI, E.; THEOCHARIS, S. The role of reactive oxygen species in the pathophysiology of cardiovascular diseases and the clinical significance of myocardial redox. **Annals of Translational Medicine**, v. 5, n. 16, p. 326, ago. 2017.
- MORO, N.; DOKSHOKOVA, L.; PERUMAL VANAJA, I.; PRANDO, V.; CNUDE, S. J. A.; DI BONA, A.; BARIANI, R.; SCHIRONE, L.; BAUCE, B.; ANGELINI, A.; SCARRETTA, S.; GHIGO, A.; MONGILLO, M.; ZAGLIA, T. Neurotoxic Effect of Doxorubicin Treatment on Cardiac Sympathetic Neurons. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 19, p. 11098, 21 set. 2022.
- MURAD, H. A. S.; ALQURASHI, T. M. A.; HUSSIEN, M. A. Interactions of selected cardiovascular active natural compounds with CXCR4 and CXCR7 receptors: a molecular docking, molecular dynamics, and pharmacokinetic/toxicity prediction study. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 22, n. 1, p. 35, 4 fev. 2022.
- MUSTROPH, J.; NEEF, S.; MAIER, L. S. CaMKII as a Target for Arrhythmia Suppression. **Pharmacology & Therapeutics**, Cardiac Arrhythmias. v. 176, p. 22–31, 1 ago. 2017.
- NAGOOR MEERAN, M. F.; JAGADEESH, G. S.; SELVARAJ, P. Thymol attenuates altered lipid metabolism in β -adrenergic agonist induced myocardial infarcted rats by inhibiting tachycardia, altered electrocardiogram, apoptosis and cardiac hypertrophy. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 51–62, 1 abr. 2015.
- NAIR, A. B.; JACOB, S. A Simple Practice Guide for Dose Conversion between Animals and Human. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, v. 7, n. 2, p. 27–31, mar. 2016.
- NASCIMENTO, G. A. do; SOUZA, D. S. de; LIMA, B. S.; VASCONCELOS, C. M. L. de; ARAÚJO, A. A. de S.; DURÇO, A. O.; QUINTANS-JUNIOR, L. J.; ALMEIDA, J. R. G. da S.; OLIVEIRA, A. P.; SANTANA-FILHO, V. J. de; BARRETO, A. S.; SANTOS, M. R. V. dos. Efeitos Bradicárdicos e Antiarrítmicos do D-Limoneno em Ratos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 113, p. 925–932, 2 set. 2019.
- NASSAL, D.; GRATZ, D.; HUND, T. J. Challenges and Opportunities for Therapeutic Targeting of Calmodulin Kinase II in Heart. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 2020.

Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2020.00035>>.

Acesso em: 3 jan. 2023.

NEBIGIL, C. G.; DÉSAUBRY, L. Updates in Anthracycline-Mediated Cardiotoxicity.

Frontiers in Pharmacology, v. 9, 2018. Disponível em:

<<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2018.01262>>. Acesso em: 24 mar. 2023.

NOUR, M. S.; SARHAN, N. R.; MAZROA, S. A.; GAWISH, S. A. Histological and Immunohistochemical Study of Cardiac Telocytes in a Rat Model of Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction with a Reference to the Effect of Grape Seed Extract.

Acta Histochemica, v. 119, n. 7, p. 747–758, set. 2017.

O'BRIEN, M. E. R.; WIGLER, N.; INBAR, M.; ROSSO, R.; GRISCHKE, E.; SANTORO, A.; CATANE, R.; KIEBACK, D. G.; TOMCZAK, P.; ACKLAND, S. P.; ORLANDI, F.; MELLARS, L.; ALLAND, L.; TENDLER, C. Reduced Cardiotoxicity and Comparable Efficacy in a Phase III trial of Pegylated Liposomal Doxorubicin HCl(CAELYX™/Doxil®) versus Conventional Doxorubicin For first-Line Treatment of Metastatic Breast Cancer. **Annals of Oncology**, v. 15, n. 3, p. 440–449, 1 mar. 2004.

ORTIZ, A. R.; PISABARRO, M. T.; GAGO, F.; WADE, R. C. Prediction of Drug Binding Affinities by Comparative Binding Energy Analysis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 38, n. 14, p. 2681–2691, 1 jul. 1995.

PANTH, N.; PAUDEL, K. R.; PARAJULI, K. Reactive Oxygen Species: A Key Hallmark of Cardiovascular Disease. **Advances in Medicine**, v. 2016, p. 9152732, 2016.

PAPACONSTANTINO, J. The Role of Signaling Pathways of Inflammation and Oxidative Stress in Development of Senescence and Aging Phenotypes in Cardiovascular Disease. **Cells**, v. 8, n. 11, 04 2019.

PARK, H. M.; LEE, J. H.; YAOYAO, J.; JUN, H. J.; LEE, S. J. Limonene, a natural cyclic terpene, is an agonistic ligand for adenosine A2A receptors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 404, n. 1, p. 345–348, 7 jan. 2011.

PAYNE, D. L.; NOHRIA, A. Prevention of Chemotherapy Induced Cardiomyopathy. **Current Heart Failure Reports**, v. 14, n. 5, p. 398–403, out. 2017.

PAZOUKI, L.; NIINEMETS, Ü. Multi-Substrate Terpene Synthases: Their Occurrence and Physiological Significance. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1019, 12 jul. 2016.

PDQ Adult Treatment Editorial Board. PDQ Ovarian Epithelial, Fallopian Tube, and Primary Peritoneal Cancer Treatment. Bethesda, MD: **National Cancer Institute**.

Updated <14/03/2023>. Available

at: <https://www.cancer.gov/types/ovarian/hp/ovarian-epithelial-treatment-pdq>.

Accessed <13/01/2024>. [PMID: 26389443]

PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Bethesda (MD): **National Cancer Institute** (US); 2002-. Dictionary of Cancer Terms. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65951/>

PEOPLES, J. N.; SARAF, A.; GHAZAL, N.; PHAM, T. T.; KWONG, J. Q.

Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Heart Disease. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 51, n. 12, p. 1–13, dez. 2019.

PEREIRA, E. W. M.; HEIMFARTH, L.; SANTOS, T. K.; PASSOS, F. R. S.; SIQUEIRA-LIMA, P.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; ALMEIDA, J. R. G. da S.; CAMPOS, A. R.; COUTINHO, H. D. M.; MARTIN, P.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; QUINTANS, J. S. S. Limonene, a Citrus Monoterpene, Non-Complexed and Complexed with Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin Attenuates Acute and Chronic Orofacial Nociception in Rodents: Evidence for Involvement of the PKA and PKC

- Pathway. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 96, p. 153893, fev. 2022.
- PINNELL, J.; TURNER, S.; HOWELL, S. Cardiac Muscle Physiology. **Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain**, v. 7, n. 3, p. 85–88, 1 jun. 2007.
- PODYACHEVA, E. Y.; KUSHNAREVA, E. A.; KARPOV, A. A.; TOROPOVA, Y. G. Analysis of Models of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy in Rats and Mice. A Modern View From the Perspective of the Pathophysiologist and the Clinician. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 670479, 3 jun. 2021.
- PORTER, B.; VAN DUIJVENBODEN, S.; BISHOP, M. J.; ORINI, M.; CLARIDGE, S.; GOULD, J.; SIENIEWICZ, B. J.; SIDHU, B.; RAZAVI, R.; RINALDI, C. A.; GILL, J. S.; TAGGART, P. Beat-to-Beat Variability of Ventricular Action Potential Duration Oscillates at Low Frequency During Sympathetic Provocation in Humans. **Frontiers in Physiology**, v. 9, 4 abr. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5893843/>>. Acesso em: 17 nov. 2018.
- PORTUGAL, R. D. Obesity and dose individualization in cancer chemotherapy: The role of body surface area and body mass index. **Medical Hypotheses**, v. 65, n. 4, p. 748–751, 1 jan. 2005.
- POSTEMA, P. G.; WILDE, A. A. M. The Measurement of the QT Interval. **Current Cardiology Reviews**, v. 10, n. 3, p. 287–294, ago. 2014.
- POTOČNIK, N.; PERŠE, M.; CERAR, A.; INJAC, R.; FINDERLE, Ž. Cardiac Autonomic Modulation Induced by Doxorubicin in a Rodent Model of Colorectal Cancer and the Influence of Fullerenol Pretreatment. **PLOS ONE**, v. 12, n. 7, p. e0181632, 20 jul. 2017.
- PRATHUMSAP, N.; SHINLAPAWITTAYATORN, K.; CHATTIPAKORN, S. C.; CHATTIPAKORN, N. Effects of Doxorubicin on the Heart: From Molecular Mechanisms to Intervention Strategies. **European Journal of Pharmacology**, v. 866, p. 172818, 5 jan. 2020.
- PSOTOVÁ, J.; CHLOPCÍKOVÁ, S.; MIKETOVÁ, P.; SIMÁNEK, V. Cytoprotectivity of *Prunella Vulgaris* on Doxorubicin-Treated Rat Cardiomyocytes. **Fitoterapia**, v. 76, n. 6, p. 556–561, set. 2005.
- QIAN, B. **A Randomized Phase II Trial of Limonene for Pulmonary Nodule Chemoprevention**. [s.l.] clinicaltrials.gov, 2 fev. 2023. . Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05525260>>. Acesso em: 12 abr. 2023.
- QIU, Y.; JIANG, P.; HUANG, Y. Anthracycline-induced cardiotoxicity: mechanisms, monitoring, and prevention. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 10, 2023. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcvm.2023.1242596>>. Acesso em: 13 jan. 2024.
- QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; BARRETO, R. S. S.; MENEZES, P. P.; ALMEIDA, J. R. G. S.; VIANA, A. F. S. C.; OLIVEIRA, R. C. M.; OLIVEIRA, A. P.; GELAIN, D. P.; DE LUCCA JÚNIOR, W.; ARAÚJO, A. A. S. β -Cyclodextrin-Complexed (–)-Linalool Produces Antinociceptive Effect Superior to That of (–)-Linalool in Experimental Pain Protocols. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 113, n. 3, p. 167–172, 2013.
- RAWAT, P. S.; JAISWAL, A.; KHURANA, A.; BHATTI, J. S.; NAVIK, U. Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: An Update on the Molecular Mechanism and Novel Therapeutic Strategies for Effective Management. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 139, p. 111708, 1 jul. 2021.

- REAGAN-SHAW S, NIHAL M, AHMAD N. Dose translation from animal to human studies revisited. **FASEB J.** 2008 Mar;22(3):659-61. doi: 10.1096/fj.07-9574LSF. Epub 2007 Oct 17. PMID: 17942826.
- REHMAN, M. U.; TAHIR, M.; KHAN, A. Q.; KHAN, R.; ODAY-O-HAMIZA, null; LATEEF, A.; HASSAN, S. K.; RASHID, S.; ALI, N.; ZEESHAN, M.; SULTANA, S. D-Limonene Suppresses Doxorubicin-Induced Oxidative Stress and Inflammation via Repression of COX-2, iNOS, and NFκB in Kidneys of Wistar Rats. **Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)**, v. 239, n. 4, p. 465–476, abr. 2014.
- RENU, K.; V.G., A.; P.B., T. P.; ARUNACHALAM, S. Molecular Mechanism of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy – An Update. **European Journal of Pharmacology**, v. 818, p. 241–253, 5 jan. 2018.
- RF LINS, L. C.; SANTOS, I. M. A.; MELO, M. S. de; MENEZES, P. D. P.; S ARAÚJO, A. A.; NUNES, R. D. S.; DOS SANTOS, M. R. V.; MEDEIROS, I. A. de; RIBEIRO, E. A. N.; SANTOS, J. R. D.; MARCHIORO, M. The Anticonvulsant Effect of Geraniol and Inclusion Complex Geraniol: Beta-Cyclodextrin. **Bol. latinoam. Caribe plantas med. aromát**, p. 557–565, 2014.
- RHANA, P.; BARROS, G. M.; SANTOS, V. C. de O.; COSTA, A. D.; SANTOS, D. M. D.; FERNANDES-BRAGA, W.; DURÇO, A. O.; SANTOS, M. R. V.; ROMAN-CAMPOS, D.; VASCONCELOS, C. M. L. de; CRUZ, J. S.; SOUZA, D. S. S-Limonene Protects the Heart in an Experimental Model of Myocardial Infarction Induced by Isoproterenol: Possible Involvement of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. **European Journal of Pharmacology**, v. 930, p. 175134, 5 set. 2022.
- RIPA, R.; GEORGE, T.; SHUMWAY, K. R.; SATTAR, Y. Physiology, Cardiac Muscle. *Em*: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.
- ROBISON, A. J. Emerging Role of CaMKII in Neuropsychiatric Disease. **Trends in Neurosciences**, v. 37, n. 11, p. 653–662, nov. 2014.
- ROLF, M. G.; CURWEN, J. O.; VELDMAN-JONES, M.; EBERLEIN, C.; WANG, J.; HARMER, A.; HELLAWELL, C. J.; BRADDOCK, M. In Vitro Pharmacological Profiling of R406 Identifies Molecular Targets Underlying the Clinical Effects of Fostamatinib. **Pharmacology Research & Perspectives**, v. 3, n. 5, p. e00175, out. 2015.
- ROWE, G. C.; JIANG, A.; ARANY, Z.; KELLY, D. P. PGC-1 Coactivators in Cardiac Development and Disease. **Circulation Research**, v. 107, n. 7, p. 825–838, out. 2010.
- ROY, A. J.; STANELY MAINZEN PRINCE, P. Preventive Effects of P-Coumaric Acid on Cardiac Hypertrophy and Alterations in Electrocardiogram, Lipids, and Lipoproteins in Experimentally Induced Myocardial Infarcted Rats. **Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 60, p. 348–354, out. 2013.
- ROY, K.; KAR, S.; DAS, R. N. Other Related Techniques. **Understanding the Basics of QSAR for Applications in Pharmaceutical Sciences and Risk Assessment**, p. 357–425, 2015.
- RZAJEW, J.; RADZIK, T.; REBAS, E. Calcium-Involved Action of Phytochemicals: Carotenoids and Monoterpenes in the Brain. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 4, p. 1428, jan. 2020.
- SAG, C. M.; KÖHLER, A. C.; ANDERSON, M. E.; BACKS, J.; MAIER, L. S. CaMKII-dependent SR Ca leak contributes to doxorubicin-induced impaired Ca handling in isolated cardiac myocytes. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 51, n. 5, p. 749–759, nov. 2011.
- SAMESIMA, N.; GOD, E. G.; KRUSE, J. C. L.; LEAL, M. G.; PINHO, C.; FRANÇA, F. F. A. C.; PIMENTA, J.; CARDOSO, A. F.; PAIXÃO, A.; FONSECA, A.; PÉREZ-

- RIERA, A. R.; RIBEIRO, A. L. P.; MADALOSO, B. A.; LUNA FILHO, B.; OLIVEIRA, C. A. R.; GRUPI, C. J.; MOREIRA, D. A. R.; KAISER, E.; PAIXÃO, G. M. M.; FEITOSA FILHO, G.; PEREIRA FILHO, H. G.; GRINDLER, J.; AZIZ, J. L.; MOLINA, M. S.; FACIN, M.; TOBIAS, N. M. M. O.; OLIVEIRA, P. A.; SANCHES, P. C. R.; TEIXEIRA, R. A.; ATANES, S. M.; PASTORE, C. A. Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre a Análise e Emissão de Laudos Eletrocardiográficos – 2022. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 119, n. 4, p. 638-680, set. 2022.
- SÁNCHEZ-LARA, K.; UGALDE-MORALES, E.; MOTOLA-KUBA, D.; GREEN, D. Gastrointestinal Symptoms and Weight Loss in Cancer Patients Receiving Chemotherapy. **British Journal of Nutrition**, v. 109, n. 05, p. 894–897, mar. 2013.
- SÁNCHEZ-MARZO, N.; LOZANO-SÁNCHEZ, J.; CÁDIZ-GURREA, M.D.L.L.; HERRANZ-LÓPEZ, M.; MICOL, V.; SEGURA-CARRETERO, A. Relationships Between Chemical Structure and Antioxidant Activity of Isolated Phytocompounds from Lemon Verbena. *Antioxidants* 2019, 8, 324. <https://doi.org/10.3390/antiox808032>
- SANDAMALI, J. A. N.; HEWAWASAM, R. P.; FERNANDO, M. A. C. S. S.; JAYATILAKA, K. A. P. W. Electrocardiographic and biochemical analysis of anthracycline induced cardiotoxicity in breast cancer patients from Southern Sri Lanka. **BMC Cancer**, v. 23, n. 1, p. 210, 4 mar. 2023.
- SANTOS, A. C. O.; SOUZA, J. a. S.; CONDE-GARCIA, E. A.; SOUZA, A. A.; MENEZES-FILHO, J. E. R.; OLIVEIRA, E. D.; VASCONCELOS, C. M. L. Electrocardiographic Profile of Guinea Pig Heart Submitted to Ginkgo Biloba Extract and Its Terpenoids. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, p. 819–825, dez. 2014.
- SANTOS, P. L.; BRITO, R. G.; OLIVEIRA, M. A.; QUINTANS, J. S. S.; GUIMARÃES, A. G.; SANTOS, M. R. V.; MENEZES, P. P.; SERAFINI, M. R.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M.; ARAÚJO, A. A. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Docking, characterization and investigation of β -cyclodextrin complexed with citronellal, a monoterpene present in the essential oil of *Cymbopogon* species, as an anti-hyperalgesic agent in chronic muscle pain model. **Phytomedicine**, v. 23, n. 9, p. 948–957, 15 ago. 2016.
- SAWICKI, K. T.; SALA, V.; PREVER, L.; HIRSCH, E.; ARDEHALI, H.; GHIGO, A. Preventing and Treating Anthracycline Cardiotoxicity: New Insights. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 61, n. 1, p. 309–332, 2021.
- SCHENKEL, P. C.; TAVARES, A. M. V.; FERNANDES, R. O.; DINIZ, G. P.; BERTAGNOLLI, M.; DA ROSA ARAUJO, A. S.; BARRETO-CHAVES, M. L.; RIBEIRO, M. F. M.; CLAUSELL, N.; BELLÓ-KLEIN, A. Redox-Sensitive Prosurvival and Proapoptotic Protein Expression in the Myocardial Remodeling Post-Infarction in Rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 341, n. 1–2, p. 1–8, ago. 2010.
- SCHMIDT, L.; GÖEN, T. R-Limonene Metabolism in Humans and Metabolite Kinetics after Oral Administration. **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 3, p. 1175–1185, mar. 2017.
- SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis. **Nature methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, jul. 2012.
- SCOTTI, L.; FERREIRA, E. I.; SILVA, M. S. da; SCOTTI, M. T. Chemometric Studies on Natural Products as Potential Inhibitors of the NADH Oxidase from *Trypanosoma Cruzi* Using the VolSurf Approach. **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 7363–7377, out. 2010.
- SEIFERT, C. F.; NESSER, M. E.; THOMPSON, D. F. Dexrazoxane in the Prevention of Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 28, n. 9, p. 1063–1072, set. 1994.

- SELVANATHAN, I.; SALAM, S. Prospective Function And Cardiopreventive Effect Of D-Limonene Against Adriamycin-Induced Myocardial Dysfunction In Albino Rats. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 8, n. 9, p. 165–170, 23 out. 2017.
- SERT, N. P. du; HURST, V.; AHLUWALIA, A.; ALAM, S.; AVEY, M. T.; BAKER, M.; BROWNE, W. J.; CLARK, A.; CUTHILL, I. C.; DIRNAGL, U.; EMERSON, M.; GARNER, P.; HOLGATE, S. T.; HOWELLS, D. W.; KARP, N. A.; LAZIC, S. E.; LIDSTER, K.; MACCALLUM, C. J.; MACLEOD, M.; PEARL, E. J.; PETERSEN, O. H.; RAWLE, F.; REYNOLDS, P.; ROONEY, K.; SENA, E. S.; SILBERBERG, S. D.; STECKLER, T.; WÜRBEL, H. The ARRIVE Guidelines 2.0: Updated Guidelines for Reporting Animal Research. **PLOS Biology**, v. 18, n. 7, p. e3000410, 14 jul. 2020.
- SHAH, B.; SHAIKH, M. V.; CHAUDAGAR, K.; NIVSARKAR, M.; MEHTA, A. D-Limonene Possesses Cytotoxicity to Tumor Cells but Not to Hepatocytes. **Polish Annals of Medicine**, v. 26, n. 2, p. 98–104, 16 jun. 2018.
- SHIOYA, T. A Simple Technique for Isolating Healthy Heart Cells from Mouse Models. **The Journal of Physiological Sciences**, v. 57, n. 6, p. 327–335, 2007.
- SHIVAKUMAR, P.; RANI, M. U.; REDDY, A. G.; ANJANEYULU, Y. A Study on the Toxic Effects of Doxorubicin on the Histology of Certain Organs. **Toxicology International**, v. 19, n. 3, p. 241–244, 2012.
- SHOJAEI, S.; KIUMARSI, A.; MOGHADAM, A. R.; ALIZADEH, J.; MARZBAN, H.; GHAVAMI, S. Chapter Two - Perillyl Alcohol (Monoterpene Alcohol), Limonene. *Em: BATHAIE, S. Z.; TAMANOI, F. The Enzymes. Natural Products and Cancer Signaling: Isoprenoids, Polyphenols and Flavonoids. [s.l.] Academic Press, 2014. p. 7–32.*
- SIES, H.; JONES, D. P. Reactive Oxygen Species (ROS) as Pleiotropic Physiological Signalling Agents. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 7, p. 363–383, jul. 2020.
- SILVA, G. B. A. da; SOUZA, D. S.; MENEZES-FILHO, J. E. R.; SILVA-NETO, J. A. da; CRUZ, J. dos S.; ROMAN-CAMPOS, D. R.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; VASCONCELOS, C. M. L. de. A (-)-Carvona Modula a Sinalização de Cálcio Intracelular com Ação Antiarrítmica em Corações de Ratos. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 119, n. 2, p. 294–304, 29 jul. 2022.
- SILVA, E. A. P.; CARVALHO, J. S.; DOS SANTOS, D. M.; OLIVEIRA, A. M. S.; DE SOUZA ARAÚJO, A. A.; SERAFINI, M. R.; OLIVEIRA SANTOS, L. A. B.; BATISTA, M. V. de A.; VIANA SANTOS, M. R.; SIQUEIRA QUINTANS, J. de S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; BARRETO, A. S. Cardiovascular Effects of Farnesol and Its β -Cyclodextrin Complex in Normotensive and Hypertensive Rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 901, p. 174060, 15 jun. 2021.
- SINGH, M. V.; SWAMINATHAN, P. D.; LUCZAK, E. D.; KUTSCHKE, W.; WEISS, R. M.; ANDERSON, M. E. MyD88 Mediated Inflammatory Signaling Leads to CaMKII Oxidation, Cardiac Hypertrophy and Death after Myocardial Infarction. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 52, n. 5, p. 1135–1144, 1 maio 2012.
- SONG, Z.; KO, C. Y.; NIVALA, M.; WEISS, J. N.; QU, Z. Calcium-Voltage Coupling in the Genesis of Early and Delayed Afterdepolarizations in Cardiac Myocytes. **Biophysical Journal**, v. 108, n. 8, p. 1908–1921, 21 abr. 2015.
- SOUZA, D. S. *Arritmia induzida por sobrecarga de cálcio é suprimida pelo farnesol em coração de ratos*. 2019. 84 p. Tese de Doutorado.
- SOUZA, D. S.; MARQUES, L. P.; COSTA, A. D.; CRUZ, J. S.; RHANA, P.; SANTOS-MIRANDA, A.; JOVIANO-SANTOS, J. V.; DURÇO, A. O.; VASCONCELOS, C. M. L.; ROMAN-CAMPOS, D. Experimental Hypothyroidism Induces Cardiac Arrhythmias

- and Ranolazine Reverts and Prevents the Phenotype. **Life Sciences**, v. 308, p. 120945, 1 nov. 2022.
- SOUZA, D. S. de; MENEZES-FILHO, J. E. R. de; SANTOS-MIRANDA, A.; JESUS, I. C. G. de; SILVA NETO, J. A.; GUATIMOSIM, S.; CRUZ, J. S.; VASCONCELOS, C. M. L. de. Calcium Overload-Induced Arrhythmia Is Suppressed by Farnesol in Rat Heart. **European Journal of Pharmacology**, v. 859, p. 172488, 21 jun. 2019.
- STANZIONE, F.; GIANGRECO, I.; COLE, J. C. Use of Molecular Docking Computational Tools in Drug Discovery. **Progress in Medicinal Chemistry**, v. 60, p. 273–343, 2021.
- STOBÄUS, N.; KÜPFERLING, S.; LORENZ, M.-L.; NORMAN, K. Discrepancy between Body Surface Area and Body Composition in Cancer. **Nutrition and Cancer**, v. 65, n. 8, p. 1151–1156, 2013.
- STRASSER, B.; STEINDORF, K.; WISKEMANN, J.; ULRICH, C. M. Impact of Resistance Training in Cancer Survivors: A Meta-Analysis. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 45, n. 11, p. 2080–2090, nov. 2013.
- SUBRAMANIAN, B. ECG Signal Classification and Parameter Estimation Using Multiwavelet Transform. **Biomedical Research**, v. 28, n. 7, 2017. Disponível em: <<https://www.alliedacademies.org/abstract/ecg-signal-classification-and-parameter-estimation-using-multiwavelet-transform-6995.html>>. Acesso em: 10 abr. 2023.
- SUN, J. D-Limonene: Safety and Clinical Applications. **Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic**, v. 12, n. 3, p. 259–264, set. 2007.
- SWAIN, S. M.; WHALEY, F. S.; EWER, M. S. Congestive Heart Failure in Patients Treated with Doxorubicin: A Retrospective Analysis of Three Trials. **Cancer**, v. 97, n. 11, p. 2869–2879, 1 jun. 2003.
- SWIDERSKI, J.; SAKKAL, S.; APOSTOLOPOULOS, V.; ZULLI, A.; GADANEC, L. K. Combination of Taurine and Black Pepper Extract as a Treatment for Cardiovascular and Coronary Artery Diseases. **Nutrients**, v. 15, n. 11, p. 2562, 30 maio 2023.
- TAKEMURA, G.; FUJIWARA, H. Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy from the Cardiotoxic Mechanisms to Management. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 49, n. 5, p. 330–352, 2007.
- TAPIA, L.; TORRES, J.; MENDOZA, L.; URZÚA, A.; FERREIRA, J.; PAVANI, M.; WILKENS, M. Effect of 13-Epi-Sclareol on the Bacterial Respiratory Chain. **Planta Medica**, v. 70, n. 11, p. 1058–1063, nov. 2004.
- TARPEY, M. D.; AMORESE, A. J.; BALESTRIERI, N. P.; FISHER-WELLMAN, K. H.; SPANGENBURG, E. E. Doxorubicin causes lesions in the electron transport system of skeletal muscle mitochondria that are associated with a loss of contractile function. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 51, p. 19709–19722, 20 dez. 2019.
- TCHIMENE, M. K.; OKUNJI, C. O.; IWU, M. M.; KUETE, V. 1 - Monoterpenes and Related Compounds from the Medicinal Plants of Africa. *Em*: KUETE, V. **Medicinal Plant Research in Africa**. Oxford: Elsevier, 2013. p. 1–32.
- TER KEURS, H. E. D. J.; SHINOZAKI, T.; ZHANG, Y. M.; ZHANG, M. L.; WAKAYAMA, Y.; SUGAI, Y.; KAGAYA, Y.; MIURA, M.; BOYDEN, P. A.; STUYVERS, B. D. M.; LANDESBURG, A. Sarcomere Mechanics in Uniform and Non-Uniform Cardiac Muscle: A Link between Pump Function and Arrhythmias. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, Life and Mechanosensitivity. v. 97, n. 2, p. 312–331, 1 jun. 2008.
- TERENTYEV, D.; GYÖRKE, I.; BELEVYCH, A. E.; TERENTYEVA, R.; SRIDHAR, A.; NISHIJIMA, Y.; DE BLANCO, E. C.; KHANNA, S.; SEN, C. K.; CARDOUNEL, A. J.; CARNES, C. A.; GYÖRKE, S. Redox Modification of Ryanodine Receptors

- Contributes to Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Leak in Chronic Heart Failure. **Circulation Research**, v. 103, n. 12, p. 1466–1472, 5 dez. 2008.
- TIMM, K. N.; TYLER, D. J. The Role of AMPK Activation for Cardioprotection in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 34, n. 2, p. 255–269, abr. 2020.
- TOUVAY, C.; VILAIN, B.; CARRÉ, C.; MENCIA-HUERTA, J. M.; BRAQUET, P. Effect of Limonene and Sobrerol on Monocrotaline-Induced Lung Alterations and Pulmonary Hypertension. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 107, n. 1–3, p. 272–274, 1995.
- TSCHESCHNER, H.; MEINHARDT, E.; SCHLEGEL, P.; JUNGSMANN, A.; LEHMANN, L. H.; MÜLLER, O. J.; MOST, P.; KATUS, H. A.; RAAKE, P. W. CaMKII Activation Participates in Doxorubicin Cardiotoxicity and Is Attenuated by Moderate GRP78 Overexpression. **PLOS ONE**, v. 14, n. 4, p. e0215992, 29 abr. 2019.
- TSE, G. Mechanisms of cardiac arrhythmias. **Journal of Arrhythmia**, v. 32, n. 2, p. 75–81, abr. 2016.
- TSUBOI, M.; FURUKAWA, Y.; NAKAJIMA, K.; KUROGOUCHI, F.; CHIBA, S. Inotropic, Chronotropic, and Dromotropic Effects Mediated via Parasympathetic Ganglia in the Dog Heart. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 279, n. 3, p. H1201-1207, set. 2000.
- UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; IRIE, T. Cyclodextrin Drug Carrier Systems. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, p. 2045–2076, 30 jul. 1998.
- UPADHYAY, S.; GUPTA, K. B.; MANTHA, A. K.; DHIMAN, M. A Short Review: Doxorubicin and Its Effect on Cardiac Proteins. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 122, n. 2, p. 153–165, 2021.
- UUSKÜLA-REIMAND, L.; WILSON, M. D. Untangling the Roles of TOP2A and TOP2B in Transcription and Cancer. **Science Advances**, v. 8, n. 44, p. eadd4920, 4 nov. 2022.
- VATANPARAST, J.; BAZLEH, S.; JANAHMADI, M. The Effects of Linalool on the Excitability of Central Neurons of Snail *Caucasotachea Atrolabiata*. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP**, v. 192, p. 33–39, fev. 2017.
- VENKATESH, P.; KASI, A. Anthracyclines. *Em: StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.
- VIEIRA, A. J.; BESERRA, F. P.; SOUZA, M. C.; TOTTI, B. M.; ROZZA, A. L. Limonene: Aroma of Innovation in Health and Disease. **Chemico-Biological Interactions**, v. 283, p. 97–106, 1 mar. 2018.
- VILLANI, F.; MONTI, E.; PICCININI, F.; FAVALLI, L.; LANZA, E.; ROZZA DIONIGI, A.; POGGI, P. Relationship between Doxorubicin-Induced ECG Changes and Myocardial Alterations in Rats. **Tumori**, v. 72, n. 3, p. 323–329, 30 jun. 1986.
- VOLKOVA, M.; RUSSELL, R. Anthracycline Cardiotoxicity: Prevalence, Pathogenesis and Treatment. **Current Cardiology Reviews**, v. 7, n. 4, p. 214–220, nov. 2011.
- VON HOFF, D. D.; LAYARD, M. W.; BASA, P.; DAVIS, H. L.; VON HOFF, A. L.; ROZENCWEIG, M.; MUGGIA, F. M. Risk Factors for Doxorubicin-Induced Congestive Heart Failure. **Annals of Internal Medicine**, v. 91, n. 5, p. 710–717, nov. 1979.
- WADE, R. C.; ORTIZ, A. R.; GAGO, F. Comparative Binding Energy Analysis. **Perspectives in Drug Discovery and Design**, v. 9, n. 0, p. 19–34, 1 jan. 1998.

- WALLACE, K. B.; SARDÃO, V. A.; OLIVEIRA, P. J. Mitochondrial Determinants of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. **Circulation research**, v. 126, n. 7, p. 926–941, 27 mar. 2020.
- WANG, X.; LI, G.; SHEN, W. Protective effects of D-Limonene against transient cerebral ischemia in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 15, n. 1, p. 699–706, 1 jan. 2018.
- WEBER, S.; MEYER-ROSLAU, S.; WAGNER, M.; DOBREV, D.; EL-ARMOUCHE, A. Counteracting Protein Kinase Activity in the Heart: The Multiple Roles of Protein Phosphatases. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, 2015. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2015.00270>>. Acesso em: 13 jan. 2024.
- WEISS, J. N.; GARFINKEL, A.; KARAGUEUZIAN, H. S.; CHEN, P.-S.; QU, Z. Early Afterdepolarizations and Cardiac Arrhythmias. **Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society**, v. 7, n. 12, p. 1891–1899, dez. 2010.
- XU, M.; BERMEA, K. C.; AYATI, M.; KIM, H. B.; YANG, X.; MEDINA, A.; FU, Z.; HERAVI, A.; ZHANG, X.; NA, C. H.; EVERETT, A. D.; GABRIELSON, K.; FOSTER, D. B.; PAOLOCCI, N.; MURPHY, A. M.; RAMIREZ-CORREA, G. A. Alteration in Tyrosine Phosphorylation of Cardiac Proteome and EGFR Pathway Contribute to Hypertrophic Cardiomyopathy. **Communications Biology**, v. 5, n. 1, p. 1–17, 15 nov. 2022.
- YANG, F.; CHEN, R.; LI, W.; ZHU, H.; CHEN, X.; HOU, Z.; CAO, R.; ZANG, G.; LI, Y.; ZHANG, W. D-Limonene Is a Potential Monoterpene to Inhibit PI3K/Akt/IKK- α /NF- κ B p65 Signaling Pathway in Coronavirus Disease 2019 Pulmonary Fibrosis. **Frontiers in Medicine**, v. 8, 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2021.591830>>. Acesso em: 13 jan. 2024.
- YEUNG, T. K.; CHAKRABARTI, K.; WILDING, D.; HOPEWELL, J. W. Modification of Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: Manipulation of the Dosage Schedule. **Human & Experimental Toxicology**, v. 21, n. 11, p. 607–614, nov. 2002.
- YI, X.; BEKEREDJIAN, R.; DEFILIPPIS, N. J.; SIDDIQUEE, Z.; FERNANDEZ, E.; SHOHET, R. V. Transcriptional Analysis of Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 290, n. 3, p. H1098–1102, mar. 2006.
- YOUNIS, N. S. D-Limonene Mitigate Myocardial Injury in Rats through MAPK/ERK/NF- κ B Pathway Inhibition. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology: Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology**, v. 24, n. 3, p. 259–266, 1 maio 2020.
- YOUNIS, N. S.; MOHAMED, M. E. β -Caryophyllene as a Potential Protective Agent Against Myocardial Injury: The Role of Toll-Like Receptors. **Molecules**, v. 24, n. 10, p. 1929, jan. 2019.
- YU, J.; WANG, C.; KONG, Q.; WU, X.; LU, J.-J.; CHEN, X. Recent Progress in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity and Protective Potential of Natural Products. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 40, p. 125–139, 1 fev. 2018.
- ZHANG, G.-X.; KIMURA, S.; NISHIYAMA, A.; SHOKOJI, T.; RAHMAN, M.; YAO, L.; NAGAI, Y.; FUJISAWA, Y.; MIYATAKE, A.; ABE, Y. Cardiac oxidative stress in acute and chronic isoproterenol-infused rats. **Cardiovascular Research**, v. 65, n. 1, p. 230–238, 1 jan. 2005.
- ZHANG, Q.-L.; YANG, J.-J.; ZHANG, H.-S. Carvedilol (CAR) Combined with Carnosic Acid (CAA) Attenuates Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity by Suppressing

Excessive Oxidative Stress, Inflammation, Apoptosis and Autophagy. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 109, p. 71–83, jan. 2019.