

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA - CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**BRUNA CALIXTO DE JESUS**

**EFEITO DO PRÉ-CONDICIONAMENTO COM FOTOBIMODULAÇÃO NA EXPRESSÃO DE microRNAs RELACIONADOS À DISFUNÇÃO CARDÍACA EM CARDIOMIÓCITOS VENTRICULARES HUMANOS DERIVADOS DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES SUBMETIDOS À DOXORRUBICINA.**

**São Paulo**

**2024**

**BRUNA CALIXTO DE JESUS**

**EFEITO DO PRÉ-CONDICIONAMENTO COM FOTOBIMODULAÇÃO NA EXPRESSÃO DE microRNAs RELACIONADOS À DISFUNÇÃO CARDÍACA EM CARDIOMIÓCITOS VENTRICULARES HUMANOS DERIVADOS DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES SUBMETIDOS À DOXORRUBICINA.**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Medicina- Ciências da Saúde da Universidade Nove de Julho como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências da Saúde.

**Orientador:** Prof. Dr. José Antônio Silva Júnior

**São Paulo**

**2024**

Jesus, Bruna Calixto de.

Efeito do pré-condicionamento com fotobiomodulação na expressão de microRNAs relacionados à disfunção cardíaca em cardiomiócitos ventriculares humanos derivados de células-tronco pluripotentes submetidos à doxorubicina. / Bruna Calixto de Jesus. 2024.

90 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2024.

Orientador (a): Prof. Dr. José Antônio Silva Júnior.

1. Fotobiomodulação. 2. Cardiomiócitos ventriculares. 3. Células-tronco pluripotentes. 4. MiRNAs. 5. Cardiotoxicidade.

I. Silva Júnior, José Antônio.

II. Título.

CDU 615.8

São Paulo, 27 de junho de 2024.

**TERMO DE APROVAÇÃO**

Aluna: **BRUNA CALIXTO DE JESUS**

Título da dissertação: **EFEITO DO PRÉ-CONDICIONAMENTO COM FOTOBIMODULAÇÃO NA EXPRESSÃO DE MICRORNAs RELACIONADOS À DISFUNÇÃO CARDÍACA EM CARDIOMIÓCITOS VENTRICULARES HUMANOS DERIVADOS DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES SUBMETIDOS À DOXORRUBICINA.**

Presidente: PROF. DR. JOSÉ ANTÔNIO SILVA JÚNIOR

*Jose A Silva Junior*

Membro: PROFA. DRA. STELLA REGINA ZAMUNER

*Zamuner*

Membro: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS

*Labat Marcos*

## AGRADECIMENTOS

Quero expressar minha profunda gratidão a Deus por ter me acompanhado em cada etapa da realização deste trabalho, me dando coragem e paciência para enfrentar os desafios e perseverar em minha jornada acadêmica.

Agradeço ao meu marido, Victor, e ao meu filho, Hariel, que me incentivaram nos momentos difíceis e compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho, assim como meus pais e irmãos que me deram total apoio e contribuíram para a realização deste trabalho.

Gostaria de expressar minha sincera gratidão a todos os professores do programa de mestrado em Medicina Ciências da Saúde. Seus ensinamentos foram inestimáveis para o meu desenvolvimento acadêmico e profissional. Em especial, desejo agradecer ao Professor Dr. José Antônio Silva Júnior pelas correções e orientações que contribuíram significativamente para o aprimoramento do meu desempenho ao longo do curso. Sua dedicação e expertise foram fundamentais para o meu crescimento como profissional da área da saúde.

Sou grata aos meus colegas de pesquisa, com quem convivi intensamente nos últimos anos, pelo companheirismo e pela troca de experiências que me permitiram crescer cientificamente, especialmente, gostaria de mencionar meu colega Allan Atum, que compartilhou seus conhecimentos ao longo de toda nossa jornada acadêmica, enriquecendo meu saber com suas valiosas contribuições.

À Universidade Nove de Julho, expresso minha profunda gratidão pela sua contribuição fundamental em minha formação profissional. Ao longo dos anos do curso. Além disso, gostaria de agradecer aos órgãos de fomento à pesquisa, FAPESP e CAPES, pelo suporte financeiro que tornou possível a realização deste projeto. Reconheço a importância vital de tais contribuições para impulsionar o avanço da ciência e o desenvolvimento de novos pesquisadores.

Gostaria de expressar meu agradecimento a banca avaliadora da minha tese, Professora Stella Regina Zamuner e Professor Rodrigo Labat Marcos. Sua contribuição foi fundamental para o aprimoramento do meu trabalho. A generosidade de ambos, aliada às suas observações brilhantes e precisas, não apenas aumentaram minha confiança, mas também reforçaram meu compromisso de sempre buscar a excelência.

E, por último, às pessoas com quem convivi ao longo desses anos de curso, que me incentivaram e certamente tiveram um impacto significativo em minha formação. Agradeço de coração aos professores da banca de avaliação da minha tese. Suas contribuições foram inestimáveis para a melhoria do meu trabalho. A compreensão e as observações brilhantes e precisas de cada um de vocês não apenas elevaram a qualidade da minha pesquisa, mas também aumentaram minha confiança e meu desejo de buscar sempre o melhor na minha trajetória acadêmica.

*" O limite é uma fronteira criada só pela mente". Racionais MC's*

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A cardiotoxicidade é um efeito adverso amplamente reconhecido associado à terapia do câncer, com potenciais repercussões graves a curto e longo prazo. A Doxorubicina (DOX), é um medicamento quimioterápico frequentemente utilizado no tratamento de neoplasias malignas devido à sua eficácia comprovada, no entanto, também apresenta, entre um dos seus principais efeitos colaterais, a toxicidade cardíaca, o que levanta grande preocupação em relação ao seu uso. A Fotobiomodulação (FBM), desencadeia uma cascata de eventos moleculares com potencial terapêutico em doenças cardiovasculares. A utilização do diodo emissor de luz (LED), tem sido explorado como uma fonte de tratamento para promover efeitos benéficos em tecidos biológicos. **OBJETIVO:** Analisar o perfil de expressão de miRNAs em cardiomiócitos ventriculares, derivados de células-tronco pluripotentes (HiPSC-vCMs), submetidos ao pré-condicionamento de Fotobiomodulação, expostos à doxorubicina. **MÉTODOS:** Estudo experimental *in vitro*, conduzido com HiPSC-vCMs, submetidos à pré-condicionamento com fotobiomodulação e expostos à doxorubicina. Os HiPSC-vCMs, foram alocados em 3 grupos: 1- Controle (não foram expostas a DOX e a FBM; irradiadas com uma lâmpada padrão de luz; Adição de soro fisiológico estéril); 2- grupo DOX (adição de 2 $\mu$ M de DOX por 24h) e 3- grupo DOX+ FBM (pré-condicionamento de FBM; adição de 2 $\mu$ M de DOX). O pré-condicionamento com FBM foi executado com dispositivo de LED, emitindo luz com comprimento de onda de 660nm  $\pm$  10nm, irradiância de 10 mW/cm<sup>2</sup>, por 500 segundos, resultando em uma dose de 5 J/cm<sup>2</sup>. Para o ensaio de citotoxicidade celular, utilizamos PCR em tempo real, para quantificar a expressão de microRNA. **RESULTADOS:** Após 24h da administração de doxorubicina em HiPSC-vCMs, verificamos a modulação da expressão de 12 miRNAs (92%), relacionados à disfunção celular *in vitro*. A FBM foi realizada antes da administração de DOX, a expressão de 9 miRNAs (69%), foi modulada pela irradiação. **CONCLUSÃO:** Os resultados indicaram que a doxorubicina foi capaz de alterar a expressão de microRNAs, relacionados à disfunção celular, em cardiomiócitos derivados de células-tronco. Entretanto, quando essas células foram submetidas à fotobiomodulação, observou-se uma redução significativa do efeito deletério da doxorubicina, na maioria dos ensaios experimentais.

**Palavras-chave:** Fotobiomodulação, cardiomiócitos ventriculares, células-tronco pluripotentes, miRNAs, cardiotoxicidade.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Cardiotoxicity is a widely recognized adverse effect associated with cancer therapy, with potential serious repercussions in the short and long term. Doxorubicin (DOX), is a chemotherapy drug frequently used in the treatment of malignant neoplasms due to its proven effectiveness, however, it also presents, among its main side effects, cardiac toxicity, which raises great concern regarding its use. Photobiomodulation (FBM) triggers a cascade of molecular events with therapeutic potential in cardiovascular diseases. The use of light emitting diode (LED) has been explored as a source of treatment to promote beneficial effects in biological tissues.

**OBJECTIVE:** To analyze the expression profile of miRNAs in ventricular cardiomyocytes, derived from pluripotent stem cells (HiPSC-vCMs), subjected to Photobiomodulation preconditioning, exposed to doxorubicin.

**METHODS:** In vitro experimental study, conducted with HiPSC-vCMs, subjected to preconditioning with photobiomodulation and exposed to doxorubicin. The HiPSC-vCMs were allocated into 3 groups: 1- Control (not exposed to DOX and FBM; irradiated with a standard light lamp; addition of sterile saline solution); 2- DOX group (addition of 2 $\mu$ M DOX for 24h) and 3- DOX+ FBM group (FBM preconditioning; addition of 2 $\mu$ M DOX). Preconditioning with FBM was performed with an LED device, emitting light with length wave of 660nm  $\pm$  10nm, irradiance of 10 mW/cm<sup>2</sup>, for 500 seconds, resulting in a dose of 5 J/cm<sup>2</sup>. For the cellular cytotoxicity assay, we used real-time PCR to quantify microRNA expression.

**RESULTS:** After 24h of doxorubicin administration in HiPSC-vCMs, we verified the modulation of the expression of 12 miRNAs (92%), related to cellular dysfunction in vitro. FBM was performed before DOX administration, the expression of 9 miRNAs (69%) was modulated by irradiation.

**CONCLUSION:** The results indicated that doxorubicin was capable of altering the expression of microRNAs, related to cellular dysfunction, in cardiomyocytes derived from stem cells. However, when these cells were subjected to photobiomodulation, a significant reduction in the deleterious effect of doxorubicin was observed in most experimental assays.

**Keywords:** Photobiomodulation, ventricular cardiomyocytes, pluripotent stem cells, miRNAs, cardiotoxicity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1-</b> Fronteiras da Cardio-Oncologia da atualidade .....	20
<b>Figura 2 -</b> Fatores de risco presentes no paciente com câncer que predis põem a cardiotoxicidade.....	21
<b>Figura 3-</b> Estrutura química da doxorubicina (dox, c <sub>27</sub> h <sub>29</sub> no <sub>11</sub> □ hcl) e mecanismos de ação cardiotóxicos .....	24
<b>Figura 4-</b> Estrutura molecular da doxorubicina.....	25
<b>Figura 5 -</b> Estrutura cardíaca.....	28
<b>Figura 6-</b> Mecanismo de regulação da tradução realizada pelos miRNAs .....	31
<b>Figura 7-</b> Biogênese de microRNA.....	33
<b>Figura 8-</b> Mecanismos subjacentes à fotobiomodulação nos níveis celular e molecular .....	38
<b>Figura 9-</b> Efeitos fisiológicos e clínicos da terapia a laser.....	39
<b>Figura 10 –</b> Dispositivo LED .....	46
<b>Figura 11-</b> Efeito da DOX na viabilidade das HiPSC-vCMS na ausência e presença de FBM .....	51
<b>Figura 12 -</b> Expressão de miR-1 nos grupos Controle, DOX e FBM+DOX.....	52
<b>Figura 13-</b> Expressão de mir-9 nos grupos controle, DOX e FBM+DOX.....	52
<b>Figura 14-</b> Expressão de mir-10a(figura 14a) e mir-10b (figura 14b) nos grupos controle, DOX e FBM+DOX.....	53

<b>Figura 15</b> - Expressão de miR-21 nos grupos Controle, DOX e FBM+DOX....	54
<b>Figura 16</b> - Expressão de miR-34a nos grupos Controle, DOX e FBM+DOX..	54
<b>Figura 17</b> - Expressão de miR-130a nos grupos Controle, DOX e FBM+DOX	55
<b>Figura 18-</b> Expressão de miR-133 nos grupos Controle, DOX e FBM+DOX...	56
<b>Figura 19-</b> Expressão de miR-134 nos grupos Controle, DOX e FBM+DOX...	56
<b>Figura 20-</b> Expressão de miR-153 nos grupos Controle, DOX e FBM+DOX...	57
<b>Figura 21</b> - Expressão de miR-208 nos grupos Controle, DOX e FBM+DOX..	58
<b>Figura 22</b> - Expressão de miR-335 nos grupos Controle, DOX e FBM+DOX..	58
<b>Figura 23</b> - Expressão de miR-499 nos grupos Controle, DOX e FBM+DOX..	59

#### **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1- Grau e definição .....	21
Tabela 2- Grupos amostrais, exposição recebidos e análises realizadas .....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ACTA 1</b>	Actina, alfa 1, músculo esquelético
<b>ATP</b>	Trifosfato de Adenosina
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>CM</b>	Cardiomiócitos
<b>CTGF</b>	Fator de crescimento do tecido conjuntivo
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DOX</b>	Doxorrubicina
<b>FBM/ PBM</b>	Fotobiomodulação/ (em inglês: <i>photobiomodulation</i> )
<b>hPSC</b>	Células- tronco pluripotentes
<b>hPSC-CMs</b>	Cardiomiócitos humanos derivados de células-tronco pluripotentes
<b>hPSC-vCMs</b>	Cardiomiócitos ventriculares humanos derivados de células-tronco pluripotentes
<b>H9C2</b>	Linhagem celular constituída de mioblastos imortalizados derivados do ventrículo esquerdo de ratos
<b>IC</b>	Insuficiência Cardíaca
<b>ICC</b>	Insuficiência Cardíaca Congestiva
<b>iPSC</b>	Células- tronco pluripotentes induzidas
<b>iPSC-CMs</b>	Cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas
<b>Lats1</b>	Supressora de tumor quinase 1
<b>LED</b>	Diodo Emissor de Luz
<b>MAP</b>	Proteína-quinases ativadas por mitógeno
<b>MEIS 2</b>	Proteína Homeobox
<b>miRNA</b>	Micro RNA
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
<b>MYH7B</b>	Miosina, de cadeia pesada 7B
<b>NIR</b>	Infravermelho próximo (Em inglês: <i>Near- Infrared</i> )
<b>Nelf-A/WHSC2</b>	O fator de alongamento negativoA/ proteína/codificada pelo gene WHSC2
<b>Nm</b>	Nanometro
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PBS</b>	Soro Fetal Bovino
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>PPARY</b>	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>RNA<sub>m</sub>/ mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>RNA<sub>r</sub>/ rRNA</b>	RNA ribossômico

<b>ROCK</b>	Proteína quinase 1 associada
<b>ROs/ EROs</b>	Espécies Reativas de Oxigênio
<b>SBC</b>	Sociedade Brasileira de Cardiologia
<b>SBOC</b>	Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica
<b>MI</b>	Microlitro
<b>μM</b>	Micromolar

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>CONTEXTUALIZAÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1.1	Introdução.....	15
1.2	Cardio-Oncologia.....	18
1.3	Cardiotoxicidade no tratamento antineoplásico.....	21
1.4	Morfologia celular do tecido cardíaco e características dos cardiomiócitos.....	28
1.5	MicroRNA: Fatores Reguladores do Coração.....	31
1.6	Fotobiomodulação (FBM).....	36
1.6	Justificativa e relevância da pesquisa.....	41
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
2.1	Geral	43
2.2	Específicos	43
<b>3</b>	<b>MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
3.1	Desenho do estudo.....	44
3.2	Linhagem celular.....	44
3.3	Grupos experimentais.....	45
3.4	Pré-condicionamento com terapia de fotobiomodulação (FBM).....	45
3.5	Exposição com doxorubicina.....	47
3.6	Ensaio de viabilidade.....	47
3.7	Expressão gênica por PCR quantitativo.....	48
3.8	Análise estatística.....	50
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
4.1	Viabilidade celular.....	51
4.2	Expressão relativa miR-1 elevada aumenta risco de hipertrofia.....	51
4.3	Expressão relativa miR-9 elevada aumenta risco de hipertrofia.....	52
4.4	Expressão relativa miR-10 <sup>a</sup> ( verificar) e b (elevada diminui o risco de estresse oxidativo).....	53
4.5	Expressão relativa miR-21 elevada diminui risco de hipertrofia.....	53

4.6 Expressão relativa miR-34a elevada aumenta o risco de estresse oxidativo.....	54
4.7 Expressão relativa miR-130a elevada aumenta o risco de estresse oxidativo.....	55
4.8 Expressão relativa miR-133 elevada aumenta o risco de fibrose .....	55
4.9 Expressão relativa miR-134 elevada aumenta o risco de estresse oxidativo .....	56
4.10 Expressão relativa miR-153 elevada aumenta o risco de estresse oxidativo .....	57
4.11 Expressão relativa miR-208 elevada aumenta risco de hipertrofia .....	57
4.12 Expressão relativa miR-335 elevada diminui o risco de estresse oxidativo.....	58
4.13 Expressão relativa miR-499 elevada aumenta risco de hipertrofia .....	58
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>68</b>
7. CONCLUSÃO .....	68
8. Limitações do estudo e perspectivas .....	68
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>70</b>
<b>10. ANEXOS .....</b>	<b>87</b>
10.1 Checklist para ensaios <i>in vitro</i> .....	87

# 1 CONTEXTUALIZAÇÃO

## 1.1 Introdução

Em 2009, a Sociedade Internacional de Cardio-Oncologia foi fundada com o objetivo de unir os campos da Cardiologia e da Oncologia. Seu propósito é promover cuidados adequados para pacientes com câncer, focando no diagnóstico precoce e no manejo eficaz das doenças cardiovasculares em pacientes já diagnosticados com câncer ou em progressão da doença<sup>1,2</sup>. A cardio-oncologia abrange diversas áreas, incluindo imagem cardíaca, como eletrocardiograma, ecocardiografia, ressonância cardíaca, entre outros métodos. Além disso, envolve a medicina integrada, que compreende a onco-hematologia, cirurgia cardíaca, genética, endocrinologia e biomarcadores. A abordagem multidisciplinar que é essencial, reunindo profissionais de diversas áreas da saúde, como nutrição, enfermagem e serviço social<sup>1</sup>. A cardio-oncologia se dedica ainda ao estudo da cardiotoxicidade causada pelo uso de fármacos antineoplásicos, que pode se manifestar através de condições como hipertensão arterial, doença coronária, tromboembolismo, arritmia cardíaca, insuficiência cardíaca, doenças do pericárdio e doença valvar<sup>1,2</sup>.

A Cardio-Oncologia é essencial devido às altas taxas de mortalidade associadas ao câncer e às doenças cardiovasculares<sup>1,2,3</sup>. Em 2018, o câncer foi responsável por 9,6 milhões de mortes em todo o mundo, com projeções de 704 mil novos casos entre 2023 e 2025<sup>3</sup>. Paralelamente, as doenças cardiovasculares causaram 17 milhões de óbitos nas últimas décadas mundialmente<sup>4</sup>. No Brasil, as doenças cardiovasculares representam 6,3% da taxa de mortalidade quando consideradas todas as causas de óbito em hospitais

<sup>6,7</sup>. A integração dessas áreas é crucial para enfrentar de forma eficaz esses desafios de saúde pública.

A cardiotoxicidade é um efeito adverso amplamente reconhecido no tratamento antineoplásico, associado à terapia do câncer e com potenciais repercussões graves a longo prazo<sup>2,10</sup>. Em resumo, o tratamento oncológico pode expor o paciente a fatores de risco cardiovasculares, principalmente devido à utilização de antraciclinas como a Doxorrubicina<sup>11</sup>. As antraciclinas são quinonas antitumorais extraídas do *Streptomyces peucetius*. Sua estrutura tetracíclica facilita a entrada nas células cardíacas por difusão passiva, resultando em estresse oxidativo e disfunção mitocondrial<sup>10</sup>. Além disso, seu metabolito secundário, doxorubicinol, interfere na homeostase de cálcio e ferro, também contribuindo para o estresse oxidativo<sup>10</sup>.

As células-tronco humanas pluripotentes induzidas (iPSCs) são derivadas de células somáticas e possuem a capacidade de crescer indefinidamente *in vitro*, mantendo seu potencial de diferenciação em diversos tipos celulares<sup>14</sup>. As células-tronco embrionárias são coletadas da massa interna do embrião entre 5 e 7 dias de desenvolvimento e são cultivadas para se diferenciar em vários tipos celulares, como células neurais, epiteliais e musculares esqueléticas<sup>14</sup>. As iPSCs, por sua vez, são obtidas a partir de células adultas, que são cultivadas com fatores de reprogramação<sup>14</sup>. Esses fatores possibilitam que, em algumas semanas, as células se transformem em células pluripotentes capazes de se diferenciar em vários tipos celulares, como células musculares cardíacas, sanguíneas e intestinais<sup>14</sup>.

A FBM utilizando laser de baixa intensidade ou diodo emissor de luz, tem sido explorado como uma fonte terapêutica para efeitos em tecidos biológicos,

devido seus diversos benefícios<sup>15</sup>. A irradiação da luz no fotorreceptor desencadeia a produção de oxigênio e uma série de respostas celulares que culminam na modulação da função celular, reparo de células comprometidas e proliferação celular. Isso resulta em uma resposta aprimorada nos processos de cicatrização, inflamação e fotoproteção<sup>16</sup>.

MiRNAs ou MicroRNAs são moléculas essenciais no controle regulatório da expressão genética das células animais e vegetais<sup>12</sup>. Os MicroRNAs são sintetizados partindo de determinadas sequências de DNA, e funcionam como interruptores moleculares ligando-se a moléculas de MicroRNA para bloquear sua tradução em proteínas<sup>13</sup>. Dessa forma, os MicroRNA regulam a quantidade de proteínas produzidas pelas células, desencadeando uma variedade de processos biológicos, como crescimento, desenvolvimento e resposta a estímulos ambientais<sup>13</sup>. Problemas em sua regulação podem estar associadas a várias doenças, como câncer, distúrbios metabólicos e doenças cardiovasculares<sup>13</sup>.

O presente trabalho consistiu em um estudo experimental *in vitro* que investigou os efeitos do pré-condicionamento com fotobiomodulação, seguido pela exposição à doxorrubicina. Os instrumentos de pesquisa utilizados foram cardiomiócitos ventriculares humanos derivados de células-tronco pluripotentes (hiPSC-vCMs). O objetivo do estudo foi de analisar o perfil de expressão de miRNAs em cardiomiócitos submetidos ao pré-condicionamento por fotobiomodulação e expostos à doxorrubicina, especificamente, buscamos analisar a viabilidade celular da doxorrubicina nos grupos DOX e FBM + DOX, além de investigar a expressão de 13 miRNAs associados à cardiotoxicidade.

Os miRNAs investigados foram: miR-1, miR-9, miR-10a, miR-10b, miR-21, miR-34a, miR-130a, miR-133, miR-134, miR-153, miR-208, miR-335 e miR-499.

## **1.2 Cardio-Oncologia**

Em 2009 foi instituída a Sociedade Internacional de Cardio-Oncologia com o propósito de reunir os campos da cardiologia e a oncologia, visando promover o cuidado apropriado para pacientes oncológicos<sup>1</sup>. Cardio-oncologia é o ramo da medicina dedicado ao diagnóstico precoce e manejo adequado das doenças cardiovasculares (DCV) em pacientes já diagnosticados com câncer ou em progressão da doença<sup>2</sup>. O propósito essencial dessa união é facilitar a prevenção, diagnóstico e tratamento eficaz de doenças cardiovasculares nos pacientes com câncer, garantindo que estejam preparados para receber o tratamento adequado<sup>1</sup>.

Com base nos dados da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), o câncer foi responsável pela morte de 1,2 milhão de pessoas em 2008, com 45% dos casos ocorridos na América Latina e no Caribe<sup>3</sup>. Em 2018, o número de mortes por câncer atingiu 9,6 milhões globalmente, aproximadamente 70% das mortes por câncer foram registrados em países de baixa e média renda<sup>3</sup>. Estudos apontam para uma projeção alarmante, prevendo-se que a mortalidade por câncer aumente para 2,1 milhões até 2030<sup>3</sup>. No Brasil, de acordo com dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), a uma projeção preocupante para o período de 2023 a 2025, com a estimativa de 704 mil novos casos de câncer. Esse cenário representa um desafio para a saúde pública<sup>5</sup>.

A doença cardiovascular também é uma preocupação, representando uma parcela significativa de todas as causas de morte em hospitais brasileiros.

De acordo com as informações da Organização Mundial da Saúde (OMS), a doença cardiovascular (DCV) foi responsável pela mortalidade de 17 milhões de pessoas nas últimas décadas<sup>6,7</sup>. No Brasil, quando analisadas todas as causas de óbito em hospitais, representa uma taxa de mortalidade de 6,3%<sup>6,7</sup>. Os dados previamente apresentados sobre doenças oncológicas e cardiovasculares suscitam grande preocupação para as políticas públicas, dada a sua complexidade. Segundo estudos, os pacientes com câncer estão mais propensos a desenvolver doenças cardiovasculares, principalmente devido às complicações decorrentes do tratamento, que apresentam alto risco de toxicidade cardiovascular<sup>14</sup>. A cardio-oncologia se faz importante, visto que a sinergia entre as áreas tem desempenhado um papel fundamental na minimização dos efeitos colaterais cardiovasculares em pacientes em tratamento oncológico<sup>14</sup>.

A Diretriz Brasileira de Cardio-oncologia enfatiza a importância do cuidado multidisciplinar durante e após o tratamento oncológico, com objetivo de diminuir as complicações cardiovasculares dos pacientes<sup>2</sup>. A Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) e a Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica (SBOC), com o propósito de atualizar o conhecimento e fomentar a aplicação da abordagem racional e sistemática das complicações cardiovasculares em pacientes diagnosticados com câncer, reuniram um grupo de especialistas para promover o desenvolvimento de um protocolo para cuidados multidisciplinares, de acordo com a **Figura 1**:



**Figura 1-** Fronteiras da Cardio-Oncologia da atualidade. Cardiotoxicidade: hipertensão arterial, doença coronária, tromboembolismo, arritmia cardíaca, insuficiência cardíaca, doenças do pericárdio e doença valvar. abordagem multidisciplinar, nutrição, enfermagem, serviço social, fisioterapia, fonoaudiologia, terapia ocupacional, farmácia, educação física, odontologia e psicologia. imagem cardíaca: eletrocardiograma, ecocardiografia, ressonância cardíaca, angiotomografia cardiovascular, holter. medicina nuclear. medicina integrada: onco-hematologia, cirurgia cardíaca, genética, endocrinologia, fisiatria, medicina intensiva, geriatria e biomarcadores. fonte: diretriz brasileira de cardio-oncologia, (2020).

### 1.3 Cardiotoxicidade no tratamento antineoplásico

A cardiotoxicidade é um efeito adverso amplamente reconhecido que está associado à terapia do câncer, com potenciais repercussões graves a longo prazo. Sua incidência tem aumentado devido ao crescimento da sobrevivência dos pacientes com câncer<sup>2, 15</sup>. A **Figura 2** demonstra os fatores que predispoem o paciente oncológico a sofrer complicações que levam à cardiotoxicidade<sup>2</sup>.



**Figura 2** - Fatores de risco presentes no paciente com câncer que predispoem a cardiotoxicidade. Peptídeo natriurético tipo B; FEVE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo; HVE: hipertrofia ventricular esquerda; FA: fibrilação atrial; NT-proBNP: fragmento N-terminal do peptídeo natriurético tipo B; VE: ventrículo esquerdo. **Fonte:** Diretriz Brasileira de Cardio-oncologia, (2020).

Nos últimos vinte anos as definições de cardiotoxicidade em ensaios clínicos de oncologia têm se baseado principalmente nas medidas da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE)<sup>14</sup>. O Instituto Nacional de Saúde (NIH) define a cardiotoxicidade em três graus, conforme a **Tabela 1**:

Grau	Definição
I	Redução assintomática da FEVE entre 10% e 20%.
II	Redução da FEVE abaixo de 20% ou abaixo do nível considerado normal.
III	Presença de insuficiência cardíaca sintomática.

**Tabela 1**- Grau e definição. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

Os avanços no tratamento oncológico têm levado a uma maior exposição dos pacientes a fatores de risco cardiovasculares, bem como à quimioterapia, que pode apresentar potencial de cardiotoxicidade<sup>15, 16</sup>. A toxicidade cardíaca em pacientes submetidos a terapias com antraciclinas pode surgir de forma súbita ou prolongada<sup>17</sup>. A cardiotoxicidade aguda se apresenta durante a aplicação das antraciclinas ou logo após a infusão, geralmente incluindo sinais como dilatação dos vasos sanguíneos, pressão arterial baixa e problemas cardíacos temporários<sup>20</sup>. De modo geral, esse tipo de dano cardíaco não requer a interrupção dos regimes de tratamento quimioterápico antitumoral<sup>21</sup>.

A cardiotoxicidade pode ser aguda ou crônica. A aguda se caracteriza por mudanças repentinas na repolarização ventricular, variações no intervalo Q-T, arritmias e síndromes coronárias, observadas até 14 dias após o término do tratamento<sup>14</sup>. A crônica, subdividida em dois tipos conforme o momento de início dos sintomas clínicos, pode resultar em disfunção ventricular, insuficiência cardíaca congestiva e até mesmo óbito cardiovascular<sup>13</sup>.

Na década de setenta, foi identificado que o uso da quimioterapia com antraciclinas estava associado à cardiotoxicidade, uma vez que esses agentes estavam relacionados ao surgimento de insuficiência cardíaca, possivelmente irreversível<sup>1,2</sup>. As antraciclinas representam uma categoria de quinonas antitumorais extraídas do *Streptomyces peucetius*. Doxorubicina, daunorrubicina, epirrubicina, mitoxantrona e idarrubicina são os agentes quimioterápicos mais frequentemente empregados desta categoria na terapia farmacológica do câncer<sup>21</sup>.

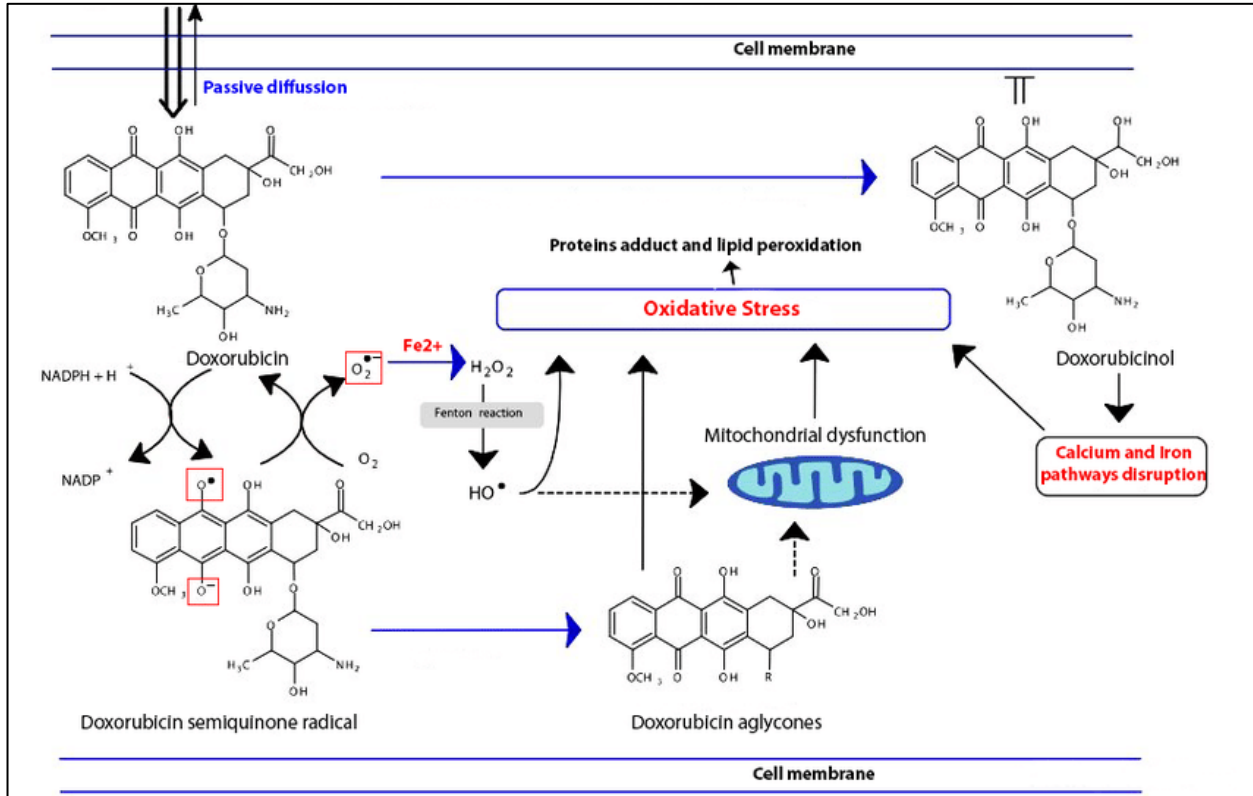
O estudo de Simunek *et al.*<sup>21</sup>, identificou as quatro formas de manifestações da cardiotoxicidade induzida por antraciclinas. Essas formas incluem

cardiotoxicidade aguda: ocorre durante a administração do fármaco ou imediatamente após, manifestando-se por vasodilatação, hipotensão e distúrbios do ritmo cardíaco. Subcrônica: ocorre entre 1 a 3 dias após a infusão, com sinais como a síndrome de pericardite-miocardite<sup>22, 23</sup>. Crônica precoce: semanas ou meses após o tratamento, caracterizada por cardiomiopatia dilatada com consequente disfunção contrátil do ventrículo esquerdo. Crônica de início tardio: décadas após a conclusão do tratamento oncológico, apresentando disfunções cardíacas<sup>22</sup>.

A cardiotoxicidade crônica convencional, por sua vez, geralmente se manifesta tardiamente durante o tratamento ou algumas semanas a meses após a conclusão da quimioterapia. Essa forma de cardiotoxicidade é marcada pelo surgimento de cardiomiopatia dilatada, seguida por disfunção ventricular contrátil e insuficiência cardíaca congestiva (ICC)<sup>19,20</sup>. As alterações histopatológicas frequentemente observadas compreendem ampliação do retículo sarcoplasmático dos miócitos cardíacos, formação de vacúolos no citoplasma, variações nas mitocôndrias, desorganização e redução de miofibrilas<sup>21, 22, 23</sup>.

A cardiotoxicidade causada pelas antraciclinas é complexa e não completamente compreendida. Pode resultar de vários processos, incluindo estresse oxidativo, interação com o DNA, desequilíbrio de cálcio celular, acúmulo de ferro, danos mitocondriais, mudanças celulares e ativação imunológica<sup>24</sup>.

A **Figura 3** demonstra a ação da doxorrubicina ao entrar na células do coração:

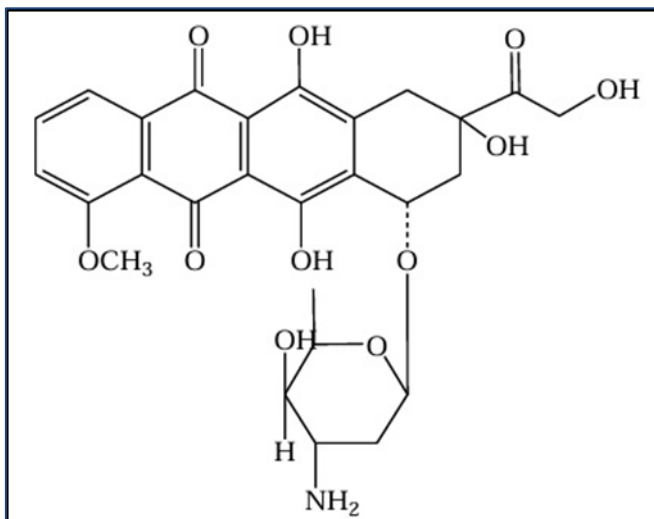


**Figura 3-** Estrutura química da doxorrubicina (dox, c27h29no11·hcl) e mecanismos de ação cardiotoxícos. A doxorrubicina possui uma estrutura tetracíclica com um grupamento carbonila que entra nos cardiomiócitos por difusão passiva. Sua redução gera radicais semiquinona, levando ao estresse oxidativo e disfunção mitocondrial. Além disso, a redução do grupamento carbonila forma o metabólito doxorubicinol, que interfere na homeostase de cálcio e ferro, contribuindo para o estresse oxidativo.

**Fonte:** Boussada, Marwa. (2020)<sup>10</sup>.

Segundo a literatura as quinonas são altamente oxidantes e podem ser reduzidas em ambientes com baixo oxigênio, como células cancerosas. Sua forma semiquinona, gera espécies reativas de oxigênio, como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, ao entrar em contato com o oxigênio molecular<sup>25</sup>.

Doxorrubicina (DOX) ou Adriamicina (C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>11</sub>) é um medicamento quimioterápico citotóxico, sua formação constitui-se de um anel tetracíclico com o grupo quinona/hidroquinona e o grupo amino açúcar titulado como daunosamina<sup>26</sup>. A **Figura 4** esquematiza a estrutura molecular do fármaco:



**Figura 4-** Estrutura molecular da doxorubicina. **Fonte:** Silva, (2013)<sup>27</sup>.

A DOX foi encontrada na década de 1950, sendo um pigmento vermelho brilhante, produzido pela bactéria *Streptomyces peucetius*<sup>26,28,29</sup>. A Doxorubicina foi validada para tratamento clínico nos Estados Unidos em 1974<sup>30</sup> em razão da sua atividade antineoplásica que, resumidamente, tem ação junto ao ácido desoxirribonucleico (DNA), bloqueando o topoisomerase II, impedindo a polimerase, inserindo-se entre os pares de base do DNA e impossibilitando a biogênese de macromoléculas, ocasionando-se a morte celular programada (apoptose), assim causando a formação de radicais livres no tempo de sua metabolização<sup>26,30</sup>, por esse motivo a DOX é frequentemente utilizada no tratamento de neoplasia maligna, principalmente na terapêutica de leucemias, linfomas e tumores sólidos, visando reduzir a velocidade ou interromper o crescimento das células cancerosas<sup>29,31</sup>.

A doxorubicina é indicada para o tratamento de carcinomas de cabeça e pescoço, tireoide, pulmão, mama, estômago, pâncreas, fígado, bexiga, próstata, leucemias, linfomas, mieloma múltiplo, sarcomas ósseos e extraósseos, mesoteliomas, tumores de células germinativas de ovário ou testículo, e também neuroblastoma.

“Desde 1976, a administração de adriamicina juntamente com ciclofosfamida, vincristina e prednisona (CHOP, ciclofosfamida, hidroxildaunomicina [Doxorubicina], oncovin [vincristina], prednisona) tem sido a combinação quimioterápica mais utilizada no tratamento de linfomas não-Hodgkin”<sup>34</sup>.

Atualmente, a Doxorubicina está na lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial de Saúde (OMS), devido a sua eficácia ser claramente comprovada pela sociedade científica, porém, um dos principais efeitos colaterais é a toxicidade cardíaca, trazendo grande preocupação com o seu uso<sup>26,29,34</sup>. Estudos comprovaram que o receio da toxicidade cardíaca como efeito colateral no uso da DOX é uma das principais razões para que muitos pacientes não recebam a dose adequada ao tratamento<sup>26,33</sup>. O trabalho de revisão sistemática e metanálise, evidenciou que o tratamento com Doxorubicina comparado com outros quimioterápicos distintos, aumentou o risco de morte por causas cardíacas<sup>33</sup>, e outros estudos mostraram que pacientes que utilizaram a administração acima de 550 mg/m<sup>2</sup>, apresentaram miocardiopatia dilatada, definida pela dilatação do ventrículo biventricular<sup>35,36,37</sup>. Dois trabalhos demonstraram que o mecanismo de toxicidade da DOX é

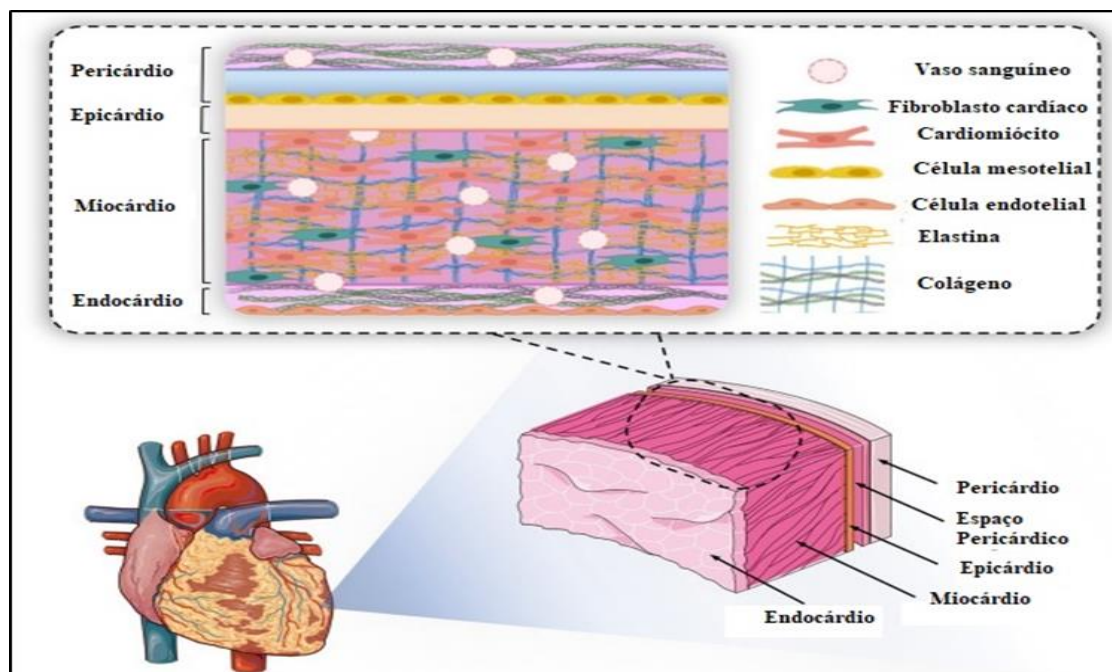
multifatorial e está relacionado com eventos cardiomiócitos negativos, sendo eles a lesão do DNA, modificação do metabolismo do cálcio e diminuição na geração de energia<sup>37,38</sup>. “Mas se destaca o estresse oxidativo como um denominador comum de todos os mecanismos”<sup>26</sup>. Pesquisas comprovaram que o principal efeito colateral é causado por uma lesão oxidativa nos cardiomiócitos, que é a célula muscular cardíaca, ou seja, impacta diretamente nas funções elétrica e contrátil do coração, ocasionando em um quadro de insuficiência cardíaca<sup>26,28,38</sup>.

É amplamente reconhecido grupo com maiores riscos de desenvolver complicações cardíacas, como hipotensão, modificações no ritmo e vasodilatação, após o tratamento com DOX, são pacientes idosos com hipertensão, diabete e enfermos com doença cardíaca preexistente<sup>39,40,41</sup>.

Vários procedimentos são utilizados para evitar ou minimizar a cardiotoxicidade ocasionada pela DOX, através de agentes protetores e o uso de antioxidantes<sup>42, 43, 44</sup>.

## 1.4 Morfologia celular do tecido cardíaco e características dos cardiomiócitos

A composição celular do coração é complexa e compreende células musculares cardíacas (CMs), fibroblastos e células endoteliais<sup>45</sup>, a **Figura 5** ilustra as células cardíacas nas diferentes camadas do coração:



**Figura 5** - Estrutura cardíaca. A estrutura endocárdica- pericárdica é delimitada, com os principais componentes celulares e extracelulares. **Fonte:** Adaptado de Montero *et al.*, (2020)<sup>45</sup>.

Notáveis são as alterações no desenvolvimento pós-natal dos cardiomiócitos. Essas células saem do ciclo celular, muitas vezes passando por uma etapa adicional de síntese de DNA sem que ocorra a divisão celular, resultando na formação de núcleos tetraploides consideráveis em humanos. Em seguida, os cardiomiócitos passam por um crescimento significativo, aumentando de tamanho de 10 a 20 vezes (hipertrofia)<sup>46</sup>.

Durante a lactação, os cardiomiócitos passam a utilizar a oxidação dos ácidos graxos como principal fonte de ATP, com as mitocôndrias ocupando cerca de 30% do volume celular. O crescimento celular resulta principalmente da

ampliação do sistema contrátil, caracterizado por miofibrilas alinhadas e sarcômeros organizados<sup>47</sup>.

A configuração dos canais iônicos no sarcolema sofre reconfiguração, levando à perda da automaticidade em todas as áreas, exceto em locais especializados de marca-passo, como os nódulos sinoatrial e atrioventricular <sup>48</sup>. Células imaturas desenvolvem invaginações profundas, conhecidas como cavéolas, em direção ao núcleo da célula durante a maturação, originando os túbulos T responsáveis por transmitir estímulos de excitação ao aparato contrátil. As junções intercelulares, inicialmente circunferenciais, passam por remodelação para se tornarem junções eletromecânicas especializadas na extremidade longitudinal da célula, conhecidas como discos intercalados <sup>48</sup>.

O cardiomiócito adulto é grande e tem forma de bastonete, medindo cerca de 150µm de comprimento, 20µm de largura e 15µm de espessura, com um volume de aproximadamente 40.000 µm<sup>3</sup>. Já as hPSC-CMs cultivadas inicialmente são pequenas e circulares, com diâmetros entre 5 a 10 µm e espessura de cerca de 5 µm durante as contrações. Com o tempo em cultura, elas se alongam para uma forma oblonga, com aproximadamente 30 µm de comprimento, 10 µm de largura e um volume de cerca de 2.000 µm<sup>3</sup> depois de um período de semeadura prolongada<sup>48</sup>.

A morfologia dos cardiomiócitos adultos realizam um papel vital, não apenas na estrutura física da célula, mas também na regulação direta de outras propriedades funcionais essenciais, como a eletrofisiologia e a capacidade contrátil<sup>49</sup>. Um caso evidente é a capacitância da membrana, que está intimamente ligada à área da superfície celular. Isso implica que os

cardiomiócitos de menor tamanho apresentam uma menor velocidade de propagação de impulsos e uma reduzida velocidade máxima de subida do potencial de ação em comparação com células maiores<sup>48</sup>.

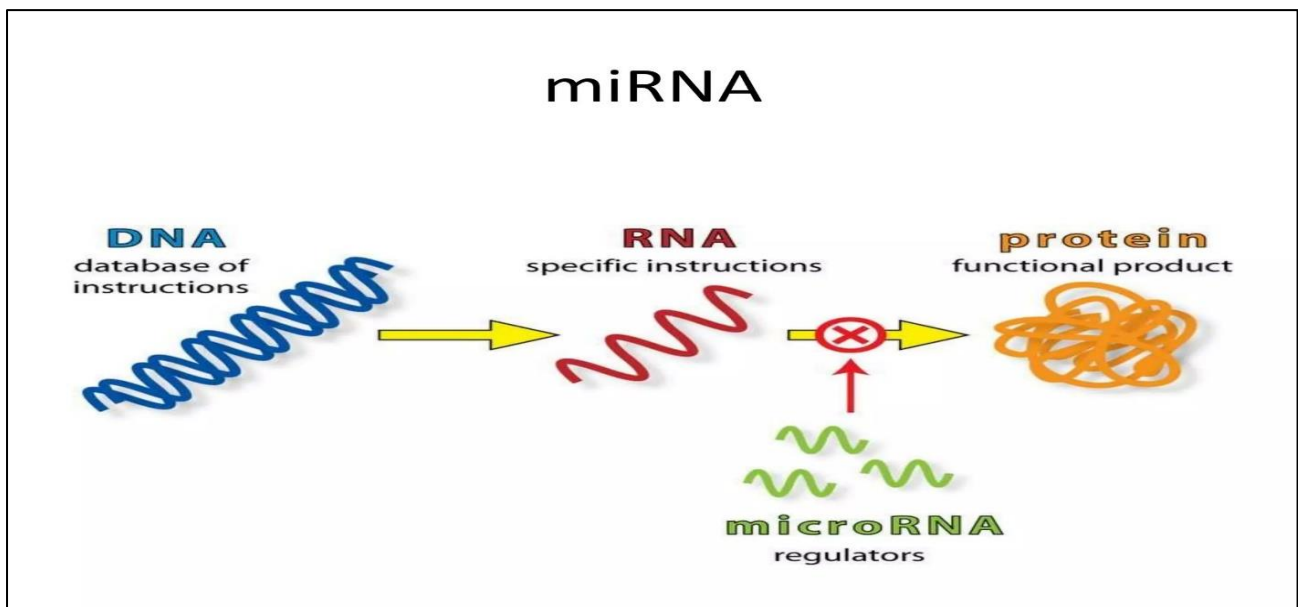
O formato alongado e anisotrópico das fibras musculares cardíacas permite uma eficiente capacidade contrátil devido à presença de miofibrilas longas com sarcômeros alinhados lateralmente<sup>48</sup>. Cardiomiócitos menores têm menor velocidade de propagação de impulsos e capacidade de aumento do potencial de ação em comparação com células maiores, devido à sua área de superfície reduzida. O formato alongado e anisotrópico dos cardiomiócitos adultos, com miofibrilas longas e sarcômeros alinhados de forma paralela, garante eficiente capacidade contrátil no músculo cardíaco<sup>49</sup>.

Os cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes humanas (hPSC-CMs) são úteis em pesquisas sobre doenças cardíacas e avanços médicos. Estão sendo cada vez mais utilizados em estudos clínicos para avaliar terapias de regeneração cardíaca<sup>48,50</sup>.

As células musculares cardíacas derivadas de células-tronco pluripotentes humanas (hPSC-CMs) compartilham muitas características com as células musculares cardíacas humanas primárias, como expressão de canais iônicos, estrutura de sarcômero, proteínas reguladoras de cálcio, função contrátil, transientes de cálcio e mecanismo de acoplamento excitação-contração (ECC)<sup>51</sup>. No entanto, sua utilidade é limitada devido à sua semelhança com as células musculares cardíacas humanas imaturas encontradas em estágios embrionários ou fetais, diferindo em termos de estrutura e função das células musculares cardíacas humanas maduras, o que restringe sua aplicação clínica<sup>52</sup>.

## 1.5 MicroRNA: Fatores Reguladores do Coração

Os microRNA (miRNA) são moléculas essenciais no controle regulatório da expressão genética das células animais e vegetais<sup>13</sup>. O lin-4 (do inglês lineage-deficient-4) foi o primeiro miRNA encontrado, em 1993, despertando o interesse para pesquisas futuras sobre esse achado<sup>54,56,57</sup>. Recentemente, foram identificados mais de 18 mil miRNAs diferentes, em 168 espécies cadastradas no banco de dados miRBase ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org))<sup>13,58</sup> dentre eles, cerca de 1.000 miRNAs em humanos<sup>54</sup>. A **FIGURA 6** mostra o mecanismo de regulação da tradução realizadas pelos miRNAs:



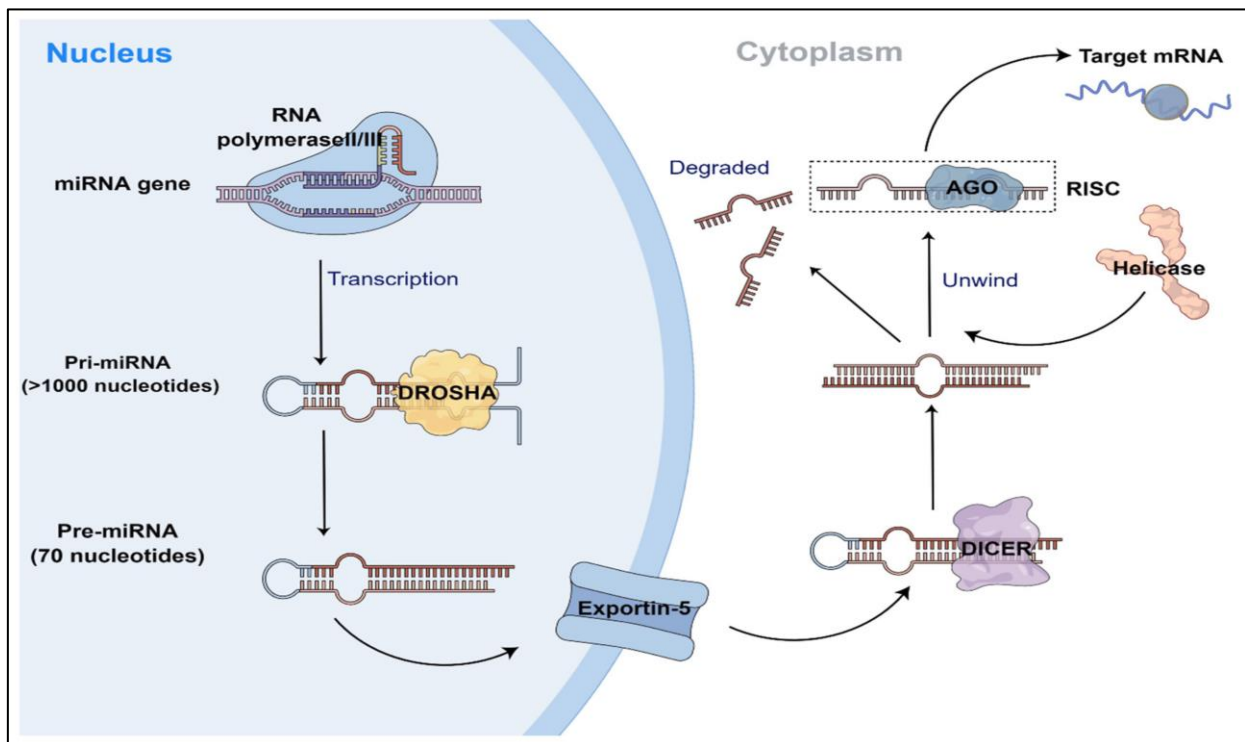
**Figura 6-** Mecanismo de regulação da tradução realizada pelos miRNAs. O miRNA liga-se ao RNAm alvo, bloqueando a produção da proteína e suas funções. Essa inibição ocorre pela complementariedade de bases, resultando na destruição do RNAm ou no bloqueio da tradução. Adaptado de Szu H (2017)<sup>62</sup>.

Os miRNAs, através de uma complexa via metabólica, que começa no núcleo e termina no citoplasma celular, podem alterar positivamente ou negativamente o papel de regulação da expressão genética<sup>13,59,60</sup>. Os miRNAs

conseguem atingir o segmento de uma molécula de DNA, interferindo no genótipo<sup>54, 61, 62</sup>.

As moléculas de miRNAs são pequenas e constituídas de ácido ribonucleico (RNA), que não codificam proteínas, têm entre 17 e 25 nucleotídeos e regulam a expressão gênica de maneira pós-transcricional<sup>63</sup>. MiRNAs são moléculas pequenas de RNA não codificantes, que controlam moléculas de RNA mensageiro alvo (mRNA), inibindo sua tradução ou ativando sua degradação<sup>64</sup>. Um transcrito primário mais longo, os pri-miRNAs, é clivado por Drosha, uma enzima de restrição que produz uma molécula estruturada em haste curta, o pré-miRNA<sup>104, 106</sup>. Em sequência, a exportina-5 envia esta molécula para o núcleo, onde é processada pela enzima nuclease denominada Dicer, que clivam moléculas de RNA dupla fita, para formar o miRNA maduro<sup>65,66,67</sup>. No citoplasma, o miRNA torna-se parte da complexa via de silenciamento induzido por RNA, em associação com a família de proteínas Argonaute, assim, esse complexo é integrado na região 3' não traduzida (3' UTR) do mRNA alvo<sup>103</sup>, inibindo sua tradução ou provocando sua degradação<sup>68,69</sup>.

A **Figura 7** demonstra a Biogênese do microRN



**Figura 7-** Biogênese de microRNA. Diagrama esquemático de síntese e processamento de mirnas. O gene do miRNA é transcrito em um pri-miRNA sob a mediação da RNA polimerase II/III e depois cortado no pri-miRNA por DROSHA; posteriormente, o pré-miRNA é transportado pela exportina-5 para o citoplasma e clivado pela endonuclease DICER; então, sob a ação da helicase, formam-se duas fitas simples, uma das quais forma RISC com AGO e a outra é degradada. **Fonte:** Biomoléculas, (2023)<sup>70</sup>.

A ligação dos miRNAs, no controle regulatório da expressão gênica, conseguem provocar o desenvolvimento de diversas doenças, entre elas as doenças cardiovasculares e oncológicas<sup>60, 73, 74, 75</sup>. Sabe-se que alguns miRNAs encontram-se expressos no coração<sup>76,77</sup> e o papel biológico dos miRNAs no sistema cardiovascular de mamíferos é importante, pois diversos estudos têm comprovado que os miRNAs estão envolvidos no desenvolvimento cardíaco embrionário e na doença cardiovascular, especificamente fibrose cardíaca e arritmia<sup>60,71,72</sup>.

As alterações nos padrões de expressão de miRNAs estão associadas a vários processos que desempenham um papel crucial na tumorigênese. Os miRNAs frequentemente se encontram desregulados em uma ampla gama de malignidades sólidas e hematológicas<sup>73</sup>. Em outras palavras, essa desregulação na expressão gênica induz danos biológicos e funcionais às células<sup>73,74,75</sup>.

Em 1997, ao ser realizada pesquisas com objetivo de identificar novos membros da superfamília TGF- $\beta$  (*Growth Differentiation Factor Beta*), a qual tem um papel relevante no desenvolvimento celular, proliferação, diferenciação, adesão, migração e apoptose<sup>78</sup>, foi encontrado uma proteína que realiza o crescimento de músculos esqueléticos, no período de desenvolvimento embrionário e na vida adulta, essa proteína ficou conhecida como Miostatina, chamada também de GDF8, que significa fator de crescimento e diferenciação-8<sup>79,80</sup> que, diferente das outras proteínas da superfamília TGF- $\beta$ , está expressa, em grande parte, na musculatura esquelética<sup>81</sup>. O gene da miostatina é transcrito como o mRNA que codifica um precursor de 375<sup>82</sup>.

Os lisossomos controlam a eliminação de resíduos celulares e contêm enzimas hidrolíticas, desempenhando um papel na reparação celular, sinalização e autofagia lisossomal. No cérebro em desenvolvimento, a atividade dos lisossomos é considerada uma defesa contra neurotoxicidade e estresse oxidativo<sup>83</sup>. Os peroxissomos modulam o estresse oxidativo, controlam a beta-oxidação de ácidos graxos e a síntese de lipídios<sup>84</sup>. Essas organelas controlam o equilíbrio redox das células, gerando e removendo radicais livres. Os genes Pex, que codificam proteínas da membrana peroxissomal, controlam a produção de peroxissomo em resposta ao estresse oxidativo<sup>84</sup>. Esses genes, que guiam proteínas da matriz dentro da estrutura, regulam a montagem de peroxissomos.

Além disso, a regulação positiva da biogênese dos peroxissomos tem sido recentemente estudado como uma opção terapêutica<sup>84</sup>.

*Rho* ou ROCK (do inglês, *Rho associated protein kinases*), são proteínas quinase expressas no tecido muscular, coração e cérebro, que compõem instrumentos essenciais no movimento de sinalização e transdução celular<sup>85</sup>. Resumidamente, a ROCK atua na adesão, migração, proliferação, apoptose e expressão genética das células, possuindo um papel importante para funções biológicas celular<sup>86, 87</sup>. Resumidamente, a ROCK atua na adesão, migração, proliferação, apoptose e expressão genética das células, possuindo um papel importante para funções biológicas celular<sup>86,87</sup>. A expressão genética cardíaca é realizada mediante regulação transcricional, que se ligam às suas cadeias de aprimoramento regulatório, para ocorrer a ativação da expressão genética, no qual os genes são controlados por diversos intensificadores, como os microRNA, que podem modificar os padrões característicos do coração<sup>92</sup>. Diversos estudos demonstraram a ligação de doenças cardiovasculares com a desregulação da atividade na via de sinalização ROCK<sup>93</sup>.

As alterações no padrão de expressão de miRNAs estão associadas com vários processos fisiológicos e biológicos, isto significa que a desregulação da expressão gênica promove danos biológicos e funcionais para as células<sup>53, 94, 60</sup>. Estima-se que cerca de um terço do genoma humano seja regulado por miRNA<sup>95</sup>.

## 1.6 Fotobiomodulação (FBM)

A laserterapia ou fotobiomodulação (FBM) tem sido amplamente utilizada em muitas situações clínicas para acelerar processos generativos de tecidos, tendo em vista seu efeito estimulador sobre a proliferação de vários tipos de células como fibroblastos, células endoteliais, células neoplásicas e osteoblastos<sup>96, 97</sup>. As baixas densidades de energia e os comprimentos de onda utilizados no LBI são capazes de penetrar facilmente para os tecidos e células. Dependendo do comprimento da onda, sua dosagem e condição do tecido, pode produzir um efeito anti-inflamatório local, reduzindo a dor e aumento a proliferação celular<sup>98,99</sup>. Assim, ao atuar em nível celular, pode provocar modificações bioquímicas, bioelétricas e bioenergéticas, promovendo aumento do metabolismo, proliferação e maturação celular, quantidade de tecido de granulação e na diminuição dos mediadores inflamatórios, induzindo o processo de cicatrização<sup>98,100</sup>.

A FBM utilizando laser de baixa intensidade ou diodo emissor de luz (LED) tem sido explorado como uma fonte terapêutica para efeitos em tecidos biológicos<sup>101</sup>. A luz interage de maneira diferente com os tecidos e moléculas biológicas, incluindo água, oxiemoglobina (HbO<sub>2</sub>), desoxiemoglobina (Hb), mioglobina, melanina, citocromos e flavinas, através de processos de absorção, espalhamento e reflexão<sup>102</sup>.

FBM uma técnica de baixo risco, não invasiva e não térmica amplamente empregada por especialistas da saúde para o tratamento de várias condições na medicina regenerativa<sup>103,104</sup>.

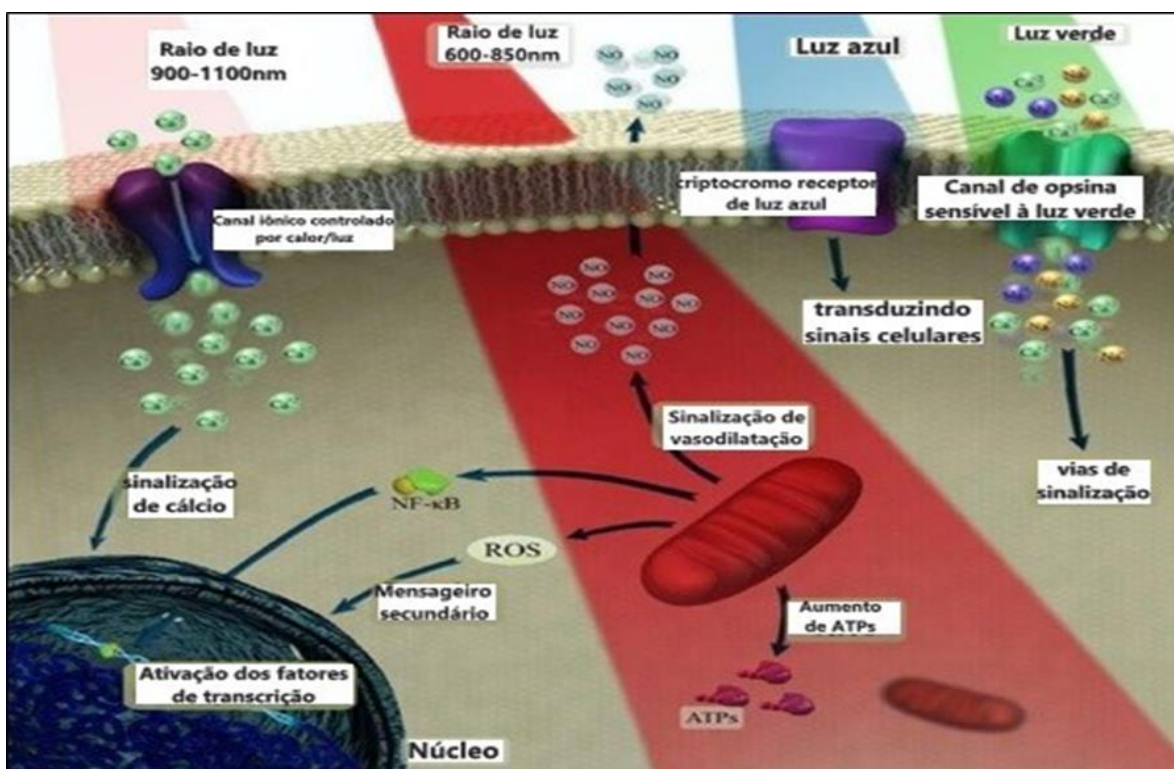
Conforme Silva *et al.* mencionaram<sup>104</sup>, uma célula possui um ponto de

sobrevivência determinado pelo tecido onde está inserida e por seu estado fisiológico. Quando a terapia de Fotobiomodulação (FBM) é aplicada dentro dessa faixa, a célula recebe uma energia de baixa intensidade que estimula sua membrana e suas mitocôndrias, resultando em biomodulação<sup>104</sup>. Nesse contexto, a célula tende a procurar uma condição normalizada na área afetada, conforme evidenciado por Ferraresi *et al.* (2015)<sup>105</sup>. A sobrevivência celular é influenciada pelo limiar determinado pelo tecido onde se encontra e pelo seu estado fisiológico<sup>106</sup>. Ao ser conduzida respeitando um limite específico, a terapia de FBM expõe a célula a uma intensidade reduzida de energia, estimulando sua membrana e mitocôndrias, resultando em biomodulação. Esse processo resulta na busca da célula por um estado de normalização na área afetada<sup>105</sup>. Mirsky e colaboradores notaram que a aplicação do FBM na região infartada mostrou associação com a neogênese vascular. Esse aumento na formação de novos vasos tem sido relacionado ao fornecimento de fatores de crescimento angiogênicos ao coração, incluindo o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)<sup>106</sup>. Além disso, o VEGF pode agir no endotélio para induzir a síntese de óxido nítrico (NO). Ambos NO e membros induzidos de NOS (iNOS) têm um papel cardioprotetor no remodelamento cardíaco. Inflamação e modulação do estresse oxidativo são levantadas como mecanismos adicionais do efeito cardioprotetor da FBM<sup>106</sup>.

Os comprimentos de onda mais comuns para aplicações incluem o visível (660 nm) e aqueles próximos ao infravermelho (810 nm e 940 nm). Menos utilizados são os do infravermelho médio (1.040 nm, 2.940 nm, 9.400 nm) e infravermelho longo (10.400 nm))<sup>105</sup>. Esse espectro de comprimentos de onda é fundamental para a Fotobiomodulação (FBM) na prática clínica, uma técnica que

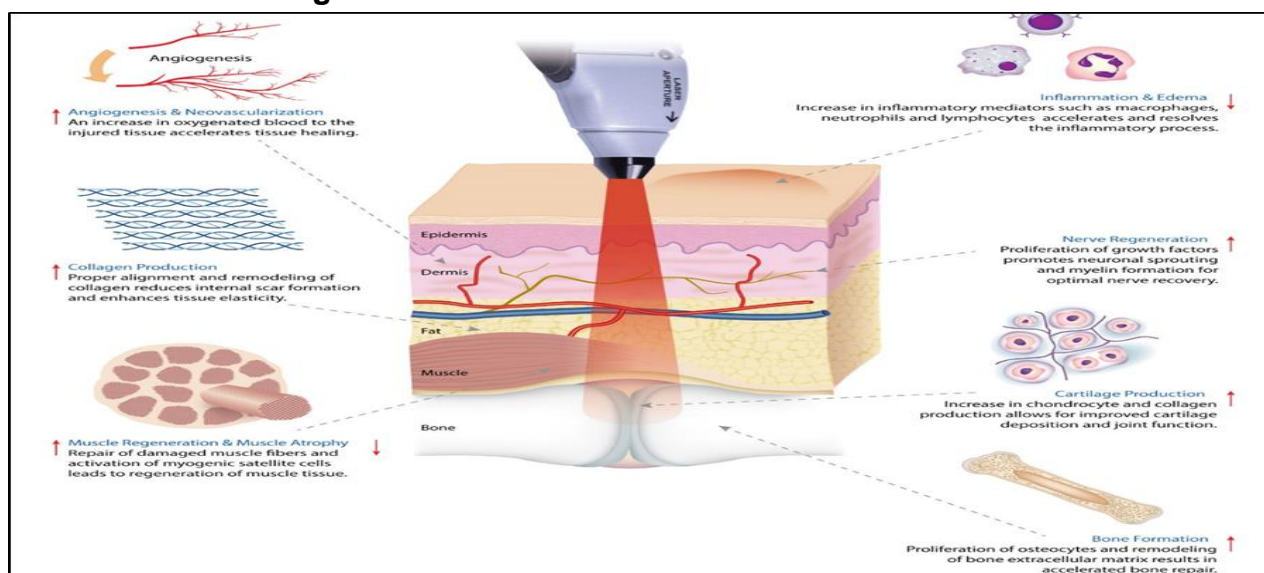
utiliza luz para modular processos biológicos no corpo. O estudo de Arany<sup>103</sup> discute esse tema, demonstrando a diversidade de aplicações da FBM. A utilização de luz em várias faixas de comprimento de onda é comum na prática clínica, evidenciando a ampla adoção da Fotobiomodulação como uma abordagem terapêutica em tratamentos médicos<sup>103</sup>.

Diversos tipos de radiação eletromagnética exercem efeitos distintos sobre as células e tecidos biológicos. A luz vermelha/NIR (infravermelho próximo) constitui uma forma de radiação que tem sido crescentemente investigada quanto aos seus impactos na biologia celular e molecular. A **Figura 6** exemplifica os mecanismos da FBM nos níveis celular e molecular<sup>107</sup>.



**Figura 8-** Mecanismos subjacentes à fotobiomodulação nos níveis celular e molecular. A luz em 600-850nm é absorvida pela cadeia mitocondrial de transferência de elétrons e leva à regulação positiva da capacidade respiratória neuronal. A luz infravermelha próxima na faixa de 900-1100nm é absorvida por aglomerados de água estruturados formados em canais iônicos. **Fonte:** adaptado de Salehpour et al., (2018)<sup>107</sup>.

A luz vermelha/NIR constitui uma forma de radiação, mais precisamente no espectro do infravermelho próximo<sup>106</sup>. Essa radiação tem a capacidade de estimular o complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial, também conhecido como citocromo c oxidase. Esse estímulo resulta em um aumento na síntese de Trifosfato de Adenosina (ATP) <sup>105</sup>. A absorção de luz pelos canais iônicos pode resultar na liberação de Ca<sup>2+</sup> e ativar fatores de transcrição e expressão gênica. Estudos indicam potencial terapêutico desses efeitos em diversas condições clínicas, como feridas crônicas, lesões musculares e dor crônica<sup>105</sup>. Conforme demonstrada na **Figura 7**:



**Figura 9-** Efeitos fisiológicos e clínicos da terapia a laser. Epiderme: Redução da inflamação e edema, com aumento de neutrófilos e linfócitos que aceleram a cicatrização; Derme: Angiogênese e neovascularização, melhorando a oxigenação do tecido e promovendo a regeneração nervosa. Tecido adiposo: Aumenta a produção de colágeno, o que melhora a elasticidade e reduz cicatrizes. Músculos: regeneração e diminuição da atrofia muscular, com ativação de células satélites. Cartilagem: aumenta a produção de condrócitos e colágeno, melhorando a função articular. Osso: Maior formação óssea e proliferação de osteócitos, acelerando a reparação óssea. **Fonte:** Terapia Laser Bioflex <https://bioflexclinic.com/laser-therapy/>.

As pesquisas em animais e ensaios clínicos em seres humanos têm revelado os benefícios terapêuticos da terapia com Fotobiomodulação (FBM)<sup>106,107,108</sup>. Esta abordagem terapêutica demonstrou efeitos regenerativos, anti-inflamatórios e analgésicos, além de promover o aumento da circulação sanguínea local, estimular o sistema linfático e aumentar a produção de colágeno<sup>106</sup>. A FBM também foi associada ao incremento da capacidade de multiplicação celular sem provocar danos moleculares significativos. Embora seu mecanismo preciso de ação ainda não esteja completamente esclarecido<sup>109</sup>, sugere-se que a FBM influencie as vias de sinalização celular, possivelmente por meio da separação do óxido nítrico inibitório da enzima, resultando em melhorias no transporte de elétrons, potencial de membrana mitocondrial e produção de ATP. Além disso, especula-se que os canais iônicos sensíveis à luz possam ser ativados durante esse processo<sup>109</sup>.

Recentemente, evidências apontaram que a fotobiomodulação é capaz de reverter a ativação de várias vias de transdução de sinal no miocárdio<sup>110</sup>. O estudo do Feliciano *et al.* demonstrou-se que a fotobiomodulação também pode modificar os processos transcricionais e pós-transcricionais relacionados à fibrose cardíaca<sup>110</sup>.

Em outro estudo foi destacado que houve uma eficácia da terapia com FBM em células cardíacas humanas, aumentando a produção de óxido nítrico e a sobrevivência celular em cardiomiócitos expostos à doxorubicina<sup>106,108,111,112</sup>. Além disso, a Terapia com Laser de Baixa Intensidade (LLLT) mostra-se promissora no tratamento de doenças cardíacas, com efeitos antiinflamatórios, antioxidantes e pró-angiogênicos<sup>113</sup>. A LLLT também pode reverter o remodelamento ventricular pós-lesão miocárdica<sup>113</sup>. Mecanismos moleculares

sugerem que a exposição à luz laser desencadeia uma série de respostas celulares, incluindo aumento na produção de ATP e geração de espécies reativas de oxigênio. Em suma, a Fotobiomodulação (FBM) é uma consequência da interação entre fótons e fotoaceitadores, desencadeando uma cascata de eventos moleculares que oferecem potencial terapêutico em doenças cardiovasculares<sup>114</sup>.

## **1.6 Justificativa e relevância da pesquisa**

O estudo da expressão de miRNAs em cardiomiócitos humanos derivados de células-tronco pluripotentes é crucial, especialmente após o pré-condicionamento com fotobiomodulação e a exposição subsequente à doxorrubicina. A doxorrubicina, embora eficaz no tratamento do câncer, está ligada à toxicidade cardíaca, que pode levar a complicações graves, como cardiomiopatia e insuficiência cardíaca. Compreender as mudanças na expressão gênica pode fornecer insights sobre os mecanismos subjacentes à toxicidade cardíaca e ajudar no desenvolvimento de estratégias de proteção cardíaca durante o tratamento do câncer<sup>115,116,117,118</sup>. Portanto, é essencial estudar os mecanismos moleculares associados à toxicidade a fim de mitigar os efeitos adversos do medicamento.

A fotobiomodulação (FBM) na pesquisa é válida pelos resultados prévios que evidenciam o potencial terapêutico das terapias com luz laser de baixa intensidade na redução de danos cardíacos<sup>113</sup> e desordens cardiovasculares<sup>101</sup>. Estudar como a FBM pode afetar a expressão gênica em cardiomiócitos expostos à doxorrubicina fornece informações sobre a possível utilização dessa alternativa para prevenir os efeitos cardiotoxicos da doxorrubicina

O emprego de células-tronco pluripotentes humanas como modelo de estudo é muito importante, uma vez que tais células oferecem uma simulação mais fiel do coração humano em contraste com os modelos animais convencionais<sup>12, 120</sup>. Essa abordagem amplifica a importância dos resultados para aplicações clínicas futuras, viabilizando uma avaliação mais precisa dos mecanismos subjacentes à toxicidade cardíaca desencadeada pela doxorrubicina e à possível redução dessa toxicidade por meio da fotobiomodulação.

A pesquisa visa identificar genes e vias específicas reguladas pela doxorrubicina, influenciadas pela fotobiomodulação. Essas descobertas podem fornecer conhecimentos valiosos para avançar terapias direcionadas e estratégias de intervenção mais precisas. Como resultado, podem ser desenvolvidos tratamentos mais eficazes e personalizados para pacientes com câncer, minimizando os riscos de toxicidade cardíaca.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Análisar o perfil de expressão de miRNAs em Cardiomiócitos ventriculares derivados de células-tronco pluripotentes submetidos ao pré-condicionamento de Fotobiomodulação expostos à doxorrubicina.

### **2.2 Específicos**

Em cardiomiócitos ventriculares obtidos a partir de células-tronco pluripotentes e expostos à doxorrubicina, realizamos a análise de:

- Toxicidade celular da doxorrubicina nos grupos DOX e FBM + DOX;
- Expressão de miRNAs: miR-1, miR-9, miR-10a e b, miR-21, miR-34a, miR-130a, miR-133, miR-134, miR-153, miR-208, miR-335, miR-499.

## 3 MÉTODOS

### 3.1 Desenho do estudo

Estudo experimental *in vitro* conduzido com cardiomiócitos ventriculares humanos, derivados de células-tronco pluripotentes, previamente submetidos à pré-condicionamento com fotobiomodulação e posteriormente expostos à doxorubicina.

### 3.2 Linhagem celular

Células de cardiomiócitos ventriculares humanos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas (hiPSC-vCMs) criopreservadas (PluriCardio) foram adquiridas da PluriCell Biotech (São Paulo, SP, Brasil). As células foram descongeladas e cultivadas de acordo com as instruções do fabricante.

As células foram semeadas em placas revestidas com *Geltrex* (*Thermo Fischer Scientific*, Waltham, MA, EUA) (250.000 células por poço em uma placa de microplacas de 6 poços) com 1 ml de Meio de plaqueamento de cardiomiócitos (Pluricell Biotech).

Quarenta e oito horas após a semeadura, o meio foi substituído por meio de manutenção de cardiomiócitos (*Pluricell Biotech*), e os testes foram realizados 24 horas após a semeadura. As células foram incubadas a 37°C em uma incubadora umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>.

foram incubadas a 37°C em uma incubadora umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>.

Vale ressaltar que as células utilizadas na pesquisa apresentam diferenças morfológicas quando comparadas aos cardiomiócitos humanos maduros, o que foi descrito por Karbassi *et al.*,<sup>48</sup>, contudo, a utilização das células é de grande vantagem para estudos *in vitro*<sup>46</sup>.

### 3.3 Grupos experimentais

As células foram alocadas em 3 grupos experimentais como mostrado a seguir:

Grupos amostrais	Exposição recebida(s)	Análises realizadas
<b>Grupo controle</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• HiPSC-vCMs não foram expostas a DOX e a FBM;</li><li>• Irradiadas com uma lâmpada padrão de luz (500 segundos);</li><li>• Adição de soro fisiológico estéril a 0,9%.</li></ul>	Análise de toxicidade, extração de RNA total e análise da expressão de microRNAs
<b>Grupo DOX</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• HiPSC-vCMs adição de 2<math>\mu</math>M de DOX por 24h</li></ul>	
<b>Grupo FBM + DOX</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• HiPSC-vCMs pré-condicionamento de FBM (500 segundos);</li><li>• Adição de 2<math>\mu</math>M de DOX.</li></ul>	

**Tabela 2-** Grupos amostrais, exposição recebidos e análises realizadas. Legenda: HiPSC-vCMs: cardiomiócitos ventriculares derivados de células-tronco pluripotentes humanas; DOX: doxorubicina; FBM: fotobiomodulação; mRNA: RNA mensageiro;  $\mu$ M: Micromolar. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

### 3.4 Pré-condicionamento com terapia de fotobiomodulação (FBM)

O pré-condicionamento com FBM foi executado utilizando um dispositivo de LED da marca BioLambda (São Paulo/SP), emitindo luz com comprimento de onda de 660nm  $\pm$  10nm e uma irradiância de 10 mW/cm<sup>2</sup>. Cada poço da placa de células foi submetido a uma irradiação de 500 segundos, resultando em uma dose de 5 J/cm<sup>2</sup>.

A entrega de luz ocorreu em modo de operação contínua (CW) dentro de uma câmara escura que cobria toda a parte inferior de cada placa, mantendo uma distância fixa de 14mm. Uma única sessão de FBM foi realizada, com a

dose de  $5 \text{ J/cm}^2$ , sendo o equipamento de luz calibrado imediatamente antes do início do estudo.

A irradiação foi conduzida em um ambiente parcialmente escuro, sem interferências de outras fontes de luz, exceto pelo dispositivo de irradiação. **Vale salientar que não havia meio de cultura presente durante o procedimento.**



**Figura 10** – Dispositivo LED. Módulo controlador compacto (Compact LED Controller Module). **Fonte:** BioLambdar<sup>121</sup>.

### 3.5 Exposição com doxorrubicina

Após a FBM, 2  $\mu$ M de DOX como descrito Atum *et al*<sup>111</sup>., foram adicionados ao meio destinado à manutenção de cardiomiócitos (fornecido pela empresa *Pluricell Biotech*, São Paulo, Brasil) dos grupos FBM+DOX. A mesma concentração de DOX foi adicionada ao meio de cultura do grupo DOX. Alternativamente, uma quantidade equivalente de solução salina estéril foi adicionada ao grupo controle.

Após um período de 24 horas, os sobrenadantes foram submetidos a um processo de centrifugação a 500xg, com duração de 10 minutos, a uma temperatura de 4°C.

O líquido do meio foi removido após a conclusão da centrifugação, e as células foram prontamente congeladas em nitrogênio líquido, sendo posteriormente armazenadas a uma temperatura de -80°C. Esse procedimento teve como objetivo viabilizar a análise subsequente por meio da técnica de qPCR.

### 3.6 Ensaio de viabilidade

Para o teste de viabilidade utilizamos o ensaio colorimétrico MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (*Sigma-Aldrich*, St Louis, MO, EUA). Resumidamente, 20 $\mu$ L de 5 mg/ml de MTT em soro fetal bovino (PBS) foram adicionados a cada poço, depois incubados por 3 horas a 37°C em uma incubadora umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>.

Em seguida, o corante não reagente foi removido, e dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado para dissolver o produto formazan roxo insolúvel intracelular em uma solução colorida. A conversão de MTT em cristal formazan

foi analisada utilizando um espectrofotômetro (*Varioskan, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA*) em um comprimento de onda de absorvância de 570nm.

### **3.7 Expressão gênica por PCR quantitativo**

#### **3.7.1 Isolamento de miRNAS**

Para extração de miRNA foi utilizado o kit de isolamento *miRVana®* miRNA (Ambion®, Austin, Tx), de acordo com as recomendações do fabricante. O precipitado de células foi homogeneizado com 500 µl do tampão de lise (10 vezes o volume da massa tecidual), e 10% do volume total de aditivo para homogeneização e logo após os tubos foram colocados em gelo por 10 minutos. Foram adicionados 500 µl de fenol-clorofórmio, e as amostras foram agitadas em *vortex* e centrifugadas na velocidade máxima (10.000g) por 5 minutos a temperatura ambiente. A fase aquosa foi então removida e transferida para um novo tubo onde foi adicionado um terço do volume de etanol 100% a temperatura ambiente. A solução então foi passada para o filtro (coluna GFX) e as amostras foram novamente centrifugadas a 10.000g por 1 minuto. O filtro foi então reservado. Ao filtrado foi adicionado 2/3 do volume de etanol e transferidos para uma nova coluna, centrifugadas e o filtrado foi descartado. Retomando os filtros com o miRNA, foram realizadas lavagens com soluções próprias do kit, intercaladas com centrifugações. Após o descarte do filtrado, centrifugamos por mais 1 min a 10.000 g para secagem da coluna. As colunas foram então repassadas para um novo tubo e então adicionamos 100 µl de água livre de RNase pré-aquecida a 95 °C, no centro da coluna. Após 1 min a temperatura ambiente, centrifugamos a coluna e os miRNA foram armazenados a -80 °C até

sua utilização. A pureza e concentração dos miRNAs foram mensuradas em espectrofotômetro Nanodrop® (ND-1000, Wilmington, EUA) (260/280nM).

### **3.7.2 Síntese de cDNA - Transcrição Reversa – microRNAs**

O DNA complementar (cDNA) do miRNA foi obtido utilizando o TaqMan® miRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Uma quantidade de 500 ng/μl de miRNA foi diluída em 20 μl de água. Deste volume 3 μl foi submetido à transcrição reversa, onde foram adicionados 7 μl de mix contendo os reagentes do kit: 0,15 μl de DNTP mix, 0,5 μl da enzima transcriptase reversa, 1,5 μl do tampão da enzima, 0,19 μl de inibidor de RNase, 3,66 μl de água livre de nucleasse e 1 μl de *primer stem-loop* com sequência específica para os miRNAs, totalizando 10 μl de cDNA. A reação foi realizada em equipamento PCR Vertiti® (Applied Biosystem, Foster City, CA) seguindo os seguintes parâmetros: 30 min a 16 °C, 30 min a 42 °C e 30 min a 85 °C.

### **3.7.3 PCR em tempo real – qPCR para análise de microRNAs**

A expressão dos miRNA estudados foi avaliada a partir do cDNA utilizando a metodologia de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (qRT-PCR) no sistema ABI 7500 Fast RT-PCR no modo standard utilizando-se Master Mix PCR Taqman Universal (Applied Biosystems, Foster City, CA). A expressão de miRNA foi analisada usando *primers* sequência-específicos para os seguintes alvos: (MiR-1, MiR-9, MiR-10a e b, MiR-21, MiR-130a, MiR-133, MiR-134, MiR-153, MiR-208, MiR-335 e MiR-499). O protocolo TaqMan® utiliza dois iniciadores não fluorescentes e uma sonda com dupla marcação que se anela à região localizada entre os

iniciadores. Esta marcação dupla é formada por um fluoróforo que emite luz quando excitado e um *quencher* que absorve luz emitida pelo fluoróforo. Durante os ciclos da PCR, a sonda é quebrada pela Taq polimerase na etapa de extensão do iniciador anelado. Esta quebra da sonda elimina a absorção pelo *quencher* que pode ser então medida através de uma câmera situada na parte superior do equipamento. A quantificação da emissão absorvida pela câmera após quebra da sonda permite a quantificação indireta do miRNA alvo contido na reação após cada ciclo da PCR. Para amplificação dos fragmentos desejados as reações foram feitas com 0,5 µl de uma solução contendo um par de *primer* e a sonda (com a marcação), 5 µl do TaqMan Master Mix, 3,5 µl de água nucleasse *free* e 1 µl de cDNA, somando um total de 10 µl para cada reação. As condições das reações foram: 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C e 40 ciclos de 15 seg a 95 °C e 1 min a 60 °C. O nível de expressão dos miRNA e dos genes alvo foi obtido pela quantificação relativa e dos níveis de expressão em vezes determinado pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Todas as reações foram realizadas em duplicata e o RNU6 foi usado como controle endógeno dos miRNA estudados.

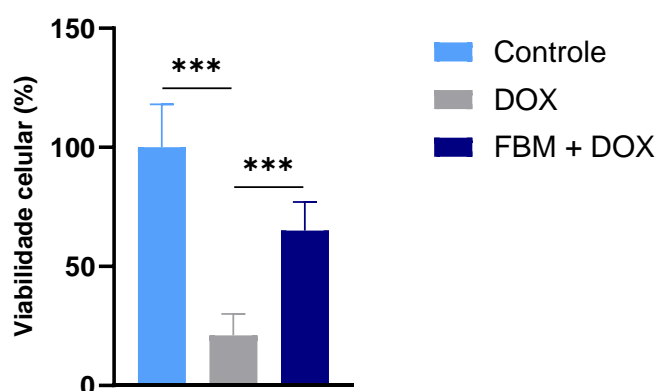
### 3.8 Análise estatística

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão (SE). O *software Prism 10.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA)* foi empregue para a análise estatística. Para comparações entre grupos foi realizado *One Way ANOVA* (para amostras independentes com distribuição paramétrica dos dados) com teste *pós-hoc* de Tukey. Para qPCR, os ensaios foram realizados em duplicata e repetidos por três vezes; os dados foram analisados pelo teste t de *Student* não pareado. A significância estatística foi definida como  $p \leq 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Viabilidade celular

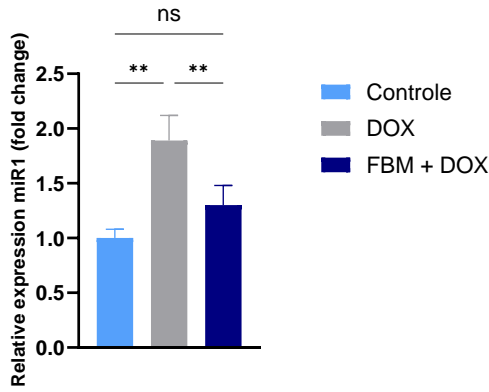
A análise de viabilidade celular com MTT evidenciou que a DOX diminuiu a viabilidade das HiPSC-vCMs, entretanto, a combinação de FBM + DOX aumentou a viabilidade celular em relação ao grupo DOX. O grupo controle não mostrou diferença em relação ao grupo FBM + DOX (**Figura 11**).



**Figura 11-** Efeito da DOX na viabilidade das HiPSC-vCMS na ausência e presença de FBM. Significativo se  $p < 0,05$ . Valores obtidos após 3 repetições.

### 4.2 Expressão relativa miR-1 elevada aumenta risco de hipertrofia

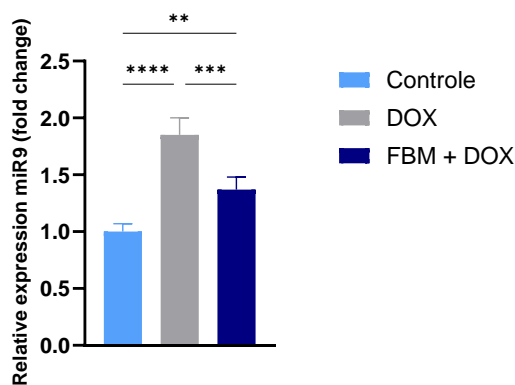
O impacto da DOX na expressão relativa dos miRNAs relacionados à disfunção cardíaca em HiPSC-vCMs foi mensurado na ausência e presença de FBM. Os resultados revelaram aumento significativo na expressão do miR-1 no grupo exposto à DOX. Entretanto, notamos redução na expressão de miR-1 no grupo FBM + DOX em comparação com o grupo DOX. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controle e o grupo FBM+ DOX (**Figura 12**).



**Figura 12** - Expressão de miR-1 nos grupos Controle, DOX e FBM+DOX. Significativo se  $p < 0,05$ . Valores obtidos após 3 repetições.

### 4.3 Expressão relativa miR-9 elevada aumenta risco de hipertrofia

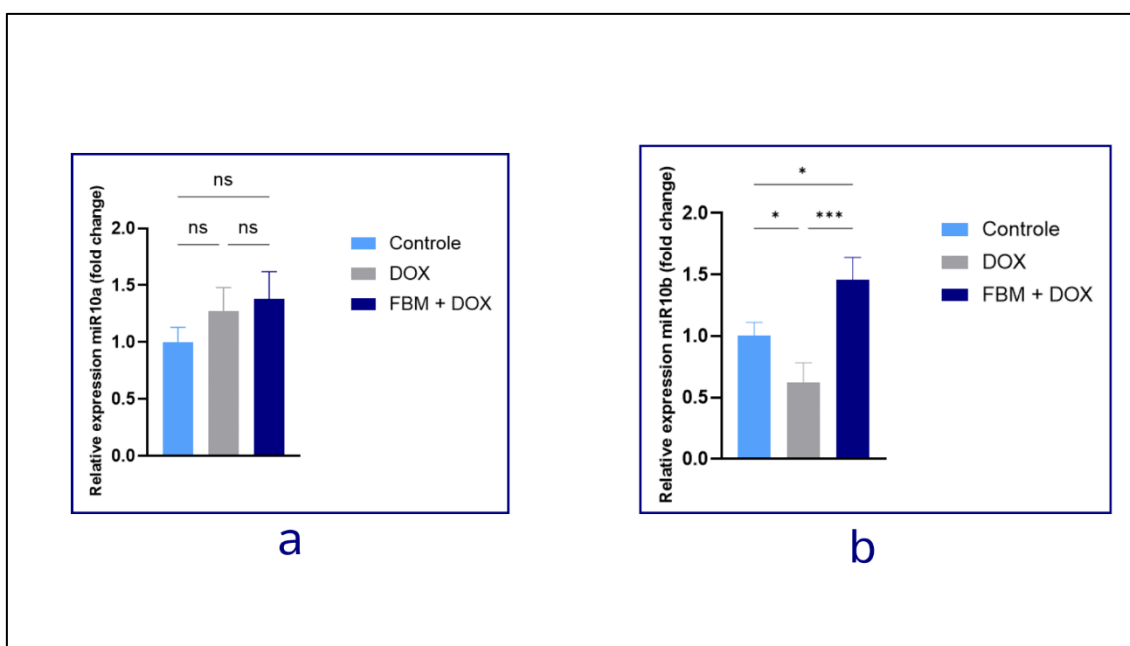
A análise da expressão do miR-9 revelou diferenças significativas entre os grupos experimentais. O grupo exposto à doxorrubicina demonstrou expressão significativamente aumentada desse microRNA em comparação com o grupo FBM + DOX (**Figura 13**). Entretanto, observou-se aumento significativa na expressão de miR-9 no grupo FBM + DOX em comparação com o grupo controle, embora menor em relação ao grupo DOX. Os resultados indicam um possível efeito modulador da FBM na expressão do miR-9 em resposta à doxorrubicina.



**Figura 13**- Expressão de mir-9 nos grupos controle, DOX e FBM+DOX. Significativo se  $p < 0,05$ . Valores obtidos após 3 repetições

#### 4.4 Expressão relativa miR-10<sup>a</sup>( verificar) e b (elevada diminui o risco de estresse oxidativo)

A **Figura 14a** indica a expressão relativa de miR-10a não apresentou diferença significativa entre os grupos estudados. Em contrapartida, foram observadas variações significativas na expressão de miR-10b nos três grupos investigados. Os resultados revelaram aumento na expressão de miR-10b no grupo FBM + DOX em comparação com o grupo controle, enquanto diminuição significativa de miR-9 foi observada no grupo DOX em relação ao grupo controle, como demonstrado na **Figura 14b**.

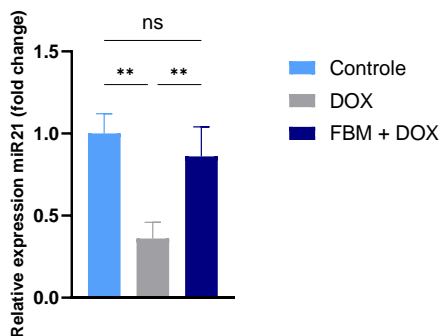


**Figura 14-** Expressão de mir-10a(figura 14a) e mir-10b (figura 14b) nos grupos controle, DOX e FBM+DOX. Significativo se  $p < 0,05$ . Valores obtidos após 3 repetições.

#### 4.5 Expressão relativa miR-21 elevada diminui risco de hipertrofia

Considerando a análise do miR-21, não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos controle e o grupo FBM+DOX. No entanto, no

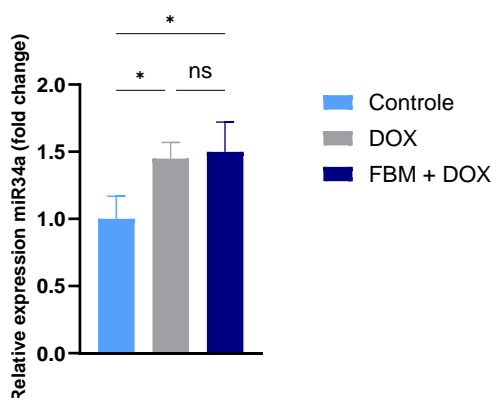
grupo DOX, observou-se redução na expressão do miR-21 em comparação com os outros grupos investigados (**Figura 15**).



**Figura 15** - Expressão de miR-21 nos grupos Controle, DOX e FBM+DOX. Significativo se  $p < 0,05$ . Valores obtidos após 3 repetições.

#### 4.6 Expressão relativa miR-34a elevada aumenta o risco de estresse oxidativo

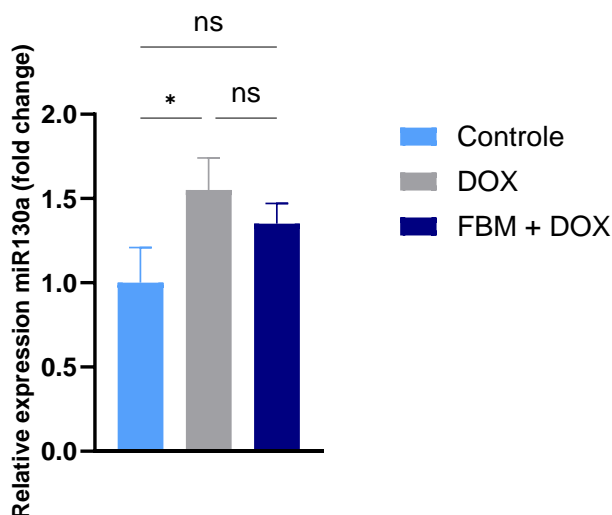
Conforme mostrado na **Figura 16**, não foi observada diferença estatisticamente significativa na expressão de miR34a entre os grupos DOX e FBM+DOX. Em ambos os grupos foi observado aumento significativo na expressão deste miRNA em comparação com o grupo controle.



**Figura 16** - Expressão de miR-34a nos grupos Controle, DOX e FBM+DOX. Significativo se  $p < 0,05$ . Valores obtidos após 3 repetições.

#### 4.7 Expressão relativa miR-130a elevada aumenta o risco de estresse oxidativo

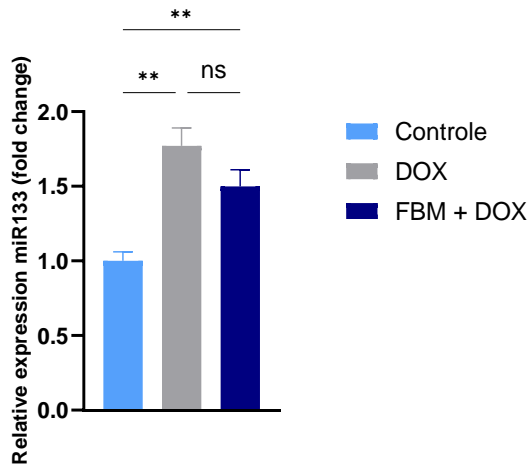
Em relação à quantificação da expressão do miR-130a, os dados apresentados na **Figura 17** revelaram que não houve diferença significativa entre os grupos experimentais FBM+DOX e DOX em comparação com o grupo controle. Os níveis de expressão de miR-130 foram maiores no grupo DOX em relação ao grupo controle (**Figura 17**).



**Figura 17** - Expressão de miR-130a nos grupos Controle, DOX e FBM+DOX.. Significativo se  $p < 0,05$ . Valores obtidos após 3 repetições.

#### 4.8 Expressão relativa miR-133 elevada aumenta o risco de fibrose

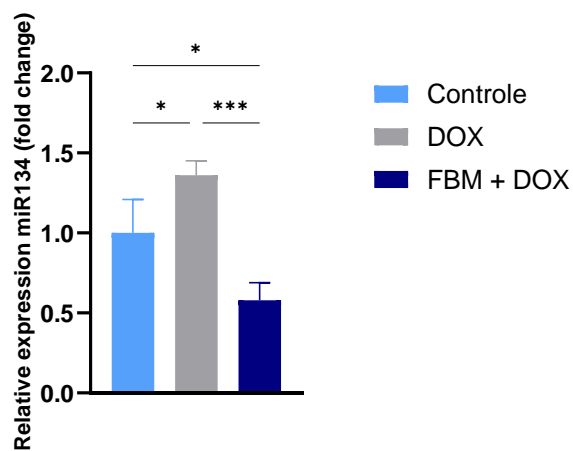
Na **Figura 18**, observamos que grupos DOX e FBM+DOX demonstraram aumento significativo na expressão do miR-133 em comparação com o grupo controle, entretanto não encontramos diferenças de expressão entre estes grupos experimentais.



**Figura 18-** Expressão de miR-133 nos grupos Controle, DOX e FBM+DOX. Significativo se  $p < 0,05$ . Valores obtidos após 3 repetições.

#### 4.9 Expressão relativa miR-134 elevada aumenta o risco de estresse oxidativo

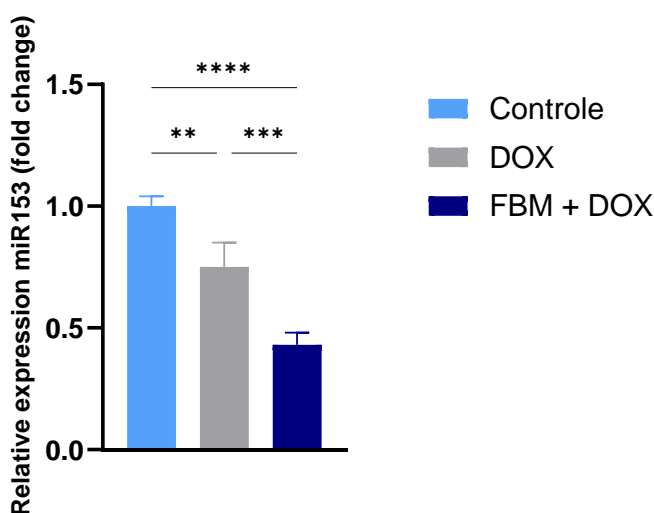
Os resultados relacionados ao miR-134 revelaram diferença significativa entre todos os grupos experimentais em relação ao controle, observado na **Figura 19**. Foi constatada redução significativa na expressão relativa do miR-134 no grupo submetido à terapia com laser (FBM+DOX) em comparação com o grupo controle e o grupo DOX.



**Figura 19-** Expressão de miR-134 nos grupos Controle, DOX e FBM+DOX. Significativo se  $p < 0,05$ . Valores obtidos após 3 repetições.

#### 4.10 Expressão relativa miR-153 elevada aumenta o risco de estresse oxidativo

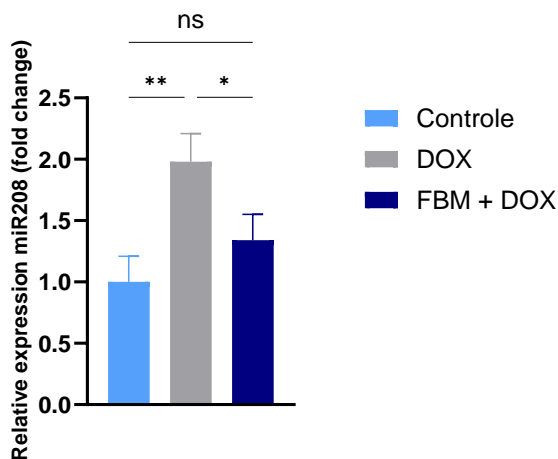
Os resultados apresentados na **Figura 20** revelam uma disparidade na expressão do miR-153 entre os grupos experimentais. Notou-se redução significativa na expressão do miR-153 no grupo de FBM+DOX em comparação com os demais grupos.



**Figura 20-** Expressão de miR-153 nos grupos Controle, DOX e FBM+DOX. Significativo se  $p < 0,05$ . Valores obtidos após 3 repetições.

#### 4.11 Expressão relativa miR-208 elevada aumenta risco de hipertrofia

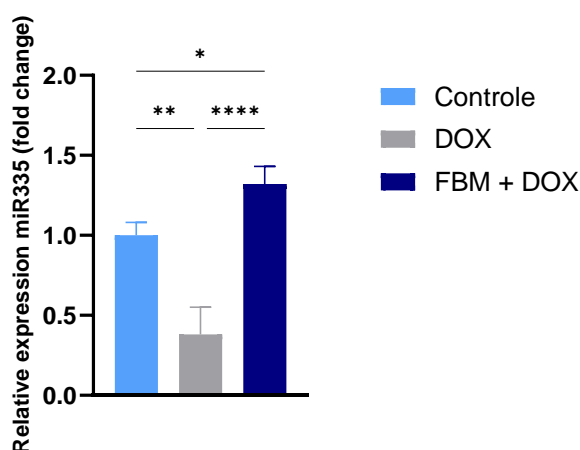
Na **Figura 21**, observamos que o grupo FBM + DOX apresentou menor expressão do miR-208 em comparação com o grupo DOX, enquanto em relação ao grupo controle não foi identificada diferença significativa. No grupo DOX, a expressão do miR-208 foi significativamente maior em comparação com os demais grupos.



**Figura 21** - Expressão de miR-208 nos grupos Controle, DOX e FBM+DOX. Significativo se  $p < 0,05$ . Valores obtidos após 3 repetições.

#### 4.12 Expressão relativa miR-335 elevada diminui o risco de estresse oxidativo

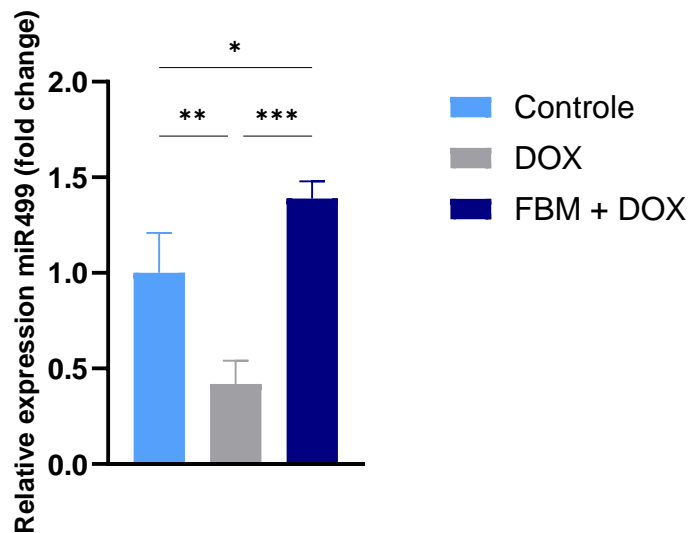
Na **Figura 22**, observamos que a expressão do miR-335 é significativamente reduzida no grupo DOX em comparação ao grupo controle. Notavelmente, o grupo FBM+DOX apresentou maior expressão em comparação com o grupo DOX.



**Figura 22** - Expressão de miR-335 nos grupos Controle, DOX e FBM+DOX. Significativo se  $p < 0,05$ . Valores obtidos após 3 repetições.

#### 4.13 Expressão relativa miR-499 elevada aumenta risco de hipertrofia

Por fim, a **Figura 23** evidencia diferença significativa na expressão de miR-499 entre todos os grupos. Observamos redução marcante no grupo exposto à doxorrubicina em comparação com os demais, enquanto o grupo FBM + DOX apresentou aumento significativo em relação aos outros grupos estudados.



**Figura 23** - Expressão de miR-499 nos grupos Controle, DOX e FBM+DOX. Significativo se  $p < 0,05$ . Valores obtidos após 3 repetições.

## 5. DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo analisar e quantificar a expressão de treze miRNAs (miR-1, miR-9, miR-10a, miR-10b, miR-21, miR-34a, miR-130a, miR-133, miR-134, miR-153, miR-208, miR-335 e miR-499) em cardiomiócitos ventriculares humanos, derivados de células-tronco pluripotentes, que foram previamente submetidos ao pré-condicionamento com fotobiomodulação e posteriormente expostos à doxorrubicina, um quimioterápico amplamente utilizado na prática clínica. A utilização dos cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas (hiPSC-CMs) é um avanço significativo na área da medicina regenerativa e apresentam vantagens em relação a outros modelos *in vitro*, como linhagens celulares imortalizadas, tecido humano pós-morte e culturas primárias provenientes de animais não humanos<sup>121</sup>. A obtenção das hiPSC-CMs é tipicamente pouco invasiva, geralmente realizada através de biópsia cutânea ou coleta sanguínea, o que oferece uma alternativa promissora para a geração de cardiomiócitos humanos em larga escala para testes clínicos de cardiotoxicidade<sup>122, 123</sup>.

Após 24 horas da administração de doxorrubicina em hiPSC-vCMs, observamos modulação na expressão gênica de diversos microRNAs associados à disfunção celular em cardiomiócitos derivados de células-tronco humanas. No entanto, quando essas células foram submetidas à fotobiomodulação, observamos redução significativa do efeito deletério da doxorrubicina em grande parte dos ensaios experimentais. O aumento da viabilidade celular observado quando as células foram pré-irradiadas com FBM

também indica que esta terapia pode ser relevante frente à cardiotoxicidade induzida pela DOX.

Os miR-1, miR-21, miR-208 e miR-499 são os principais microRNAs que regulam a hipertrofia cardíaca em várias condições patológicas<sup>123</sup>. Nossos resultados sugerem que a expressão relativa do miR-1 e do miR-208 foi reduzida no grupo FBM+DOX, enquanto os miR-21 e miR-499 foram aumentados nesse mesmo grupo. Condorelli *et al.*<sup>124</sup> verificaram que a desregulação dos microRNAs plasmáticos de miR-1, miR-499 e miR-208a de pacientes que sofreram Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) está relacionada com a necrose dos cardiomiócitos. Esses microRNAs desempenham um papel crucial na regulação genética e sua alteração pode indicar danos ou morte das células cardíacas, contribuindo para o entendimento dos mecanismos patológicos associados ao IAM<sup>126,125</sup>.

Leger *et al.*<sup>126</sup> identificaram que os miRNAs plasmáticos cardíacos sofrem desregulação dentro de um período de 24 horas após uma única sessão de tratamento com antraciclina. Esta desregulação foi confirmada pelo aumento na expressão dos microRNAs miR-1, miR-29b e miR-499 na circulação. No entanto, não houve acompanhamento dos níveis circulantes desses miRNAs durante a progressão do tratamento quimioterápico<sup>126</sup>.

Em modelos animais, o miR-1 está envolvido na multiplicação e especialização das células cardíacas durante a cardiogênese, sendo um dos microRNAs mais comuns no tecido cardíaco, desempenhando uma função crucial na regulação de vários aspectos do processo de diferenciação e reprodução dos cardiomiócitos<sup>123,127</sup>.

O estudo realizado por Carmen *et al.*<sup>128</sup>, utilizando camundongos machos, demonstrou que o aumento da expressão de miR-1 altera a condutividade cardíaca e a automaticidade ao modular a expressão de proteínas relacionadas ao controle do cálcio intracelular, resultando em arritmia<sup>128</sup>. Em estudo utilizando camundongo submetidos a uma sobrecarga de pressão no coração, foi observada que a diminuição da expressão de miR-1 foi correlacionada com a com o aumento da massa cardíaca, resultando em hipertrofia cardíaca devido à diminuição da expressão do miR-1<sup>129</sup>. Cheung *et al.*<sup>130</sup>, utilizando modelo *in vitro* de cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes humanas (hPSC), verificaram a expressão dos miR-1, miR-133a, miR-208a, miR-208b e miR-499 quando expostas à doxorrubicina, corroborando nossos resultados<sup>130</sup>.

De acordo com o estudo conduzido por Tatsuguchi e colaboradores<sup>131</sup>, a elevação da expressão do mir-21 desempenha um papel anti-hipertrófico em cardiomiócitos isolados, sugerindo que o aumento na quantidade de miR-21 resulta em um efeito protetor nas células musculares do coração<sup>131</sup>. Entretanto, outros autores sugerem que o aumento do miR-21 promove hipertrofia cardíaca ao estimular a quinase da MAP (Proteína ativada por mitógenos) em fibroblastos<sup>132,133</sup>. Em nosso estudo, observamos diminuição na expressão do miR-21 no grupo DOX (em comparação com o grupo controle), enquanto no grupo submetido ao pré-condicionamento com a fotobiomodulação, observou-se aumento na expressão do miR-21.

O bloqueio do miR-208 em modelo animal evidenciou redução na morte celular programada e na hipertrofia celular, além de diminuir a formação excessiva de tecido cicatricial no coração após a indução do infarto agudo do miocárdio (IAM)<sup>134</sup>. Esses efeitos resultaram em melhora significativa na

recuperação cardíaca pós-IAM e na capacidade do coração em bombear sangue<sup>134</sup>. Em nosso trabalho foi observamos que o grupo FBM + DOX apresentou uma redução na expressão do miR-208 em comparação com o grupo DOX, enquanto no grupo controle não foi observada diferença significativa.

No estudo realizado com camundongos, foi evidenciado que a ativação da expressão do miR-499 especificamente no coração leva a disfunção cardíaca e hipertrofia celular<sup>135</sup>. Esses efeitos ocorrem devido à modificação da expressão de proteínas contráteis, como *MYH7B* e actina alfa 1 do músculo esquelético (*ACTA1*)<sup>135</sup>. Em nosso estudo, a expressão relativa do miR-499 apresentou redução marcante no grupo tratado com doxorubicina em comparação com os demais, enquanto o grupo exposto brevemente com a fotobiomodulação apresentou aumento significativo em relação aos outros grupos estudados.

O fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) é uma proteína essencial no mecanismo de fibrose, promovendo a produção da matriz extracelular<sup>123</sup>. A Remodelação ventricular envolve várias mudanças no coração, incluindo a apoptose (morte programada) e a hipertrofia (aumento de tamanho) dos cardiomiócitos, além da fibrose intersticial (formação de tecido cicatricial) e redução da densidade dos vasos sanguíneos<sup>123,125,127,136</sup>. Essas alterações podem resultar em insuficiência cardíaca (IC)<sup>123</sup>, os miRNAs, especialmente o miR-133, desempenham um papel crucial nesse processo<sup>137</sup>. Duisters *et al.*<sup>138</sup> encontraram resultados interessantes sobre a regulação do fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) pelo miR-133 em modelos de doença cardíaca<sup>139</sup>. Eles descobriram que o miR-133 regula negativamente a expressão de CTGF, e essa regulação parece ser inversamente proporcional à expressão em modelos

de doença cardíaca em roedores e no remodelamento patológico do ventrículo esquerdo em humanos com estenose aórtica<sup>138</sup>. Da mesma forma, em humanos que passaram por cirurgia de substituição de válvula devido à estenose aórtica, verificou-se um padrão semelhante. À medida que a expressão do miR-133 aumentava, a expressão do CTGF diminuía. Essa interação resultava em uma menor deposição de colágeno no tecido cardíaco, o que é benéfico, pois reduz o risco de fibrose cardíaca e melhora a função do coração<sup>138</sup>. Esses achados sugerem que a regulação do miR-133 na expressão do CTGF pode ter implicações importantes no desenvolvimento e progressão da doença cardíaca, oferecendo possíveis alvos terapêuticos para intervenção<sup>138</sup>, no entanto, nos estudos sobre miRNAs, foi observado que o miR-133 apresentou diminuição em sua expressão durante o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca<sup>136,139,140</sup>. Liu e colaboradores<sup>141</sup> conduziram estudo demonstrando que camundongos com níveis diminuídos de miR-133 apresentaram cardiomiopatia, falência cardíaca e uma multiplicação anormal das células cardíacas<sup>141</sup>. Em nosso modelo experimental os dois grupos expostos à DOX (DOX e FBM+DOX) apresentaram aumento significativo na expressão do miR-133 em comparação com o grupo controle, não havendo modulação da FBM neste microRNA.

A expressão de miR-10b foi estudada em diversas áreas, incluindo oncologia, angiogênese, desenvolvimento embrionário e diferenciação celular<sup>143, 143, 144</sup>. Xie Y *et al.*<sup>144</sup> observaram que o miR-10b, ao ser superexpresso, aumenta a divisão e crescimento das células musculares do coração, enquanto sua redução diminui a proliferação celular<sup>144</sup>. Além disso, o miR-10b protege as células da morte programada (apoptose) ao atuar sobre a proteína LATS1 (proteína que faz parte da via Hippo, uma importante via de sinalização celular

que regula o crescimento e a morte celular <sup>52</sup>. Esses achados sugerem que o miR-10b pode ser uma ferramenta promissora para a regeneração do tecido cardíaco<sup>144</sup>. Nossos resultados apresentados revelam um padrão interessante de resposta à fotobiomodulação (FBM) em relação à expressão de miR-10b. Ao comparar o grupo FBM + doxorrubicina (DOX) com o grupo controle, observou-se um aumento significativo na expressão de miR-10b. Este achado sugere que a FBM pode influenciar positivamente a expressão de miR-10b, possivelmente desempenhando um papel na regulação gênica associada à resposta ao tratamento com DOX.

Diversos estudos sugerem uma relação entre doenças cardiovasculares e o papel dos microRNAs, especialmente o miR-34a e o miR-153. O aumento desses microRNAs pode estar fortemente associado a quatro processos: apoptose, necrose, autofagia e piroptose<sup>68, 69,77,123,145</sup>. Esses processos resultam em morte celular e desempenham um papel significativo no desenvolvimento patológico das cardiomiopatias. Analisando a possibilidade de miR-34a regular o envelhecimento e a função cardíaca, foi observado que a expressão do miR-34a aumentou em camundongos idosos comparado ao grupo de camundongos jovens, elevando a morte celular de cardiomiócitos e um declínio da função contrátil<sup>146</sup>, sugerindo que a superexpressão de miRNA-34a está associada ao envelhecimento cardíaco. Não encontramos diferença significativa na expressão do miR-34a entre os grupos expostos a DOX e FBM+DOX. Em ambos os grupos houve aumento significativo na expressão deste miRNA em comparação com o grupo controle, evidenciando que a DOX e não a FBM seja responsável pela alteração do padrão de expressão deste miRNA. Em geral, percebe-se que, em

um quadro onde os membros da família MicroRNA-34 (miR-34a, -34b e -34c) estão desregulados, há o aumento de doenças cardiovasculares<sup>145</sup>.

Em relação à expressão do miR-153, observamos diferenças entre os grupos estudados; o grupo FBM+DOX apresentou uma redução significativa na expressão desse miRNA em comparação com os outros grupos avaliados, ressaltando os efeitos benéficos da FBM. Shaharyar *et al.*<sup>145</sup> observaram que miR-153 está relacionado com a morte de cardiomiócitos, induzida pelo estresse oxidativo, enfatizando que a inibição do miR-153 reduz a apoptose e autofagia de cardiomiócitos<sup>145</sup>.

Tay *et al.*<sup>147</sup> observaram que o miR-134 possui capacidade de controlar a multiplicação das células progenitoras cardíacas humanas (hCMPC) por meio do fator de transcrição *Meis Homeobox 2* (Meis2), relevante em diversos processos de desenvolvimento<sup>147</sup>. A superexpressão de miR-134 diminuiu a multiplicação das hCMPCs, porém esse impacto foi anulado quando o *Meis2* foi reintegrado. Isso sugere que o miR-134 desempenha uma função na regulação da biologia das células progenitoras cardíacas, o que pode influenciar a cardiogênese<sup>148</sup>. Em síntese, o estudo sugere que o miR-134 controla a multiplicação das células progenitoras cardíacas, impactando os genes do ciclo celular<sup>148</sup>. Nosso trabalho revelou resultados significativos relacionados ao miR-134, evidenciando diferenças marcantes entre todos os grupos experimentais em comparação com o controle, observou-se uma redução significativa na expressão relativa do miR-134 no grupo submetido à FBM em comparação com o grupo controle e o grupo exposto à DOX.

Lee *et al.*<sup>149</sup> sugerem que o miR-130 intensifica o dano cardíaco em cardiomiócitos H9c2 em um modelo de simulação de infarto cardíaco. Esse efeito ocorre devido ao miR-130 direcionar diretamente o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma *gama* (*PPAR $\gamma$* )<sup>149</sup>. Resumidamente, os peroxissomos modulam o estresse oxidativo, controlam a beta-oxidação de ácidos graxos e a síntese de lipídios<sup>84</sup>. Essas organelas controlam o equilíbrio redox das células, gerando e removendo radicais livres<sup>84</sup>. Nossos dados sugerem que quantificação da expressão do miR-130 não apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais FBM+DOX e DOX, em comparação com o grupo controle. No entanto, os níveis de expressão de miR-130 foram mais elevados no grupo DOX.

Long X *et al.*<sup>150</sup>, utilizando modelo animal, observaram que a regulação positiva do miR-335 teve efeitos benéficos na lesão cardíaca pós-sepse, sendo esta regulação atribuída ao aumento da expressão do miR-335<sup>150</sup>. O aumento do miR-335 protegeu os cardiomiócitos contra o estresse oxidativo e a apoptose celular<sup>150</sup>. Em outro estudo, foram destacados os efeitos defensivos do miRNA-335 contra a lesão nos cardiomiócitos<sup>151</sup>. Foi evidenciado que a atividade do miR-335 apresenta um aumento substancial, o que se mostrou benéfico na proteção dos cardiomiócitos contra o estresse causado pela oxidação<sup>152,153</sup>. A expressão do miR-335 foi reduzida no grupo exposto a DOX em comparação aos outros grupos experimentais. Notavelmente, o grupo FBM+DOX apresentou uma expressão significativamente maior em relação ao grupo exposto apenas a doxorrubicina, indicando um potencial benefício da combinação FBM na modulação da expressão do miR-335.

Os microRNAs estudados desempenham papéis cruciais na regulação gênica pós-transcricional cardíaca após exposição à DOX. Os resultados satisfatórios *in vitro* e aumento da viabilidade celular após o pré-condicionamento com fotobiomodulação foram evidências de que esta terapia pode contribuir para diminuição da cardiotoxicidade da DOX.

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os resultados demonstram que a doxorrubicina é capaz de modular a expressão gênica de vários microRNAs associados à disfunção celular em cardiomiócitos derivados de células-tronco humanas. Entretanto, quando essas células foram submetidas à fotobiomodulação, observou-se uma redução significativa do efeito deletério da doxorrubicina. A maioria desses microRNAs apresentou resultados satisfatórios *in vitro* após o pré-condicionamento com fotobiomodulação.

## **7. CONCLUSÃO**

A FBM, nos parâmetros utilizados *in vitro*, foi capaz de modular a expressão de miRNAs relacionados com a redução dos efeitos adversos da doxorrubicina em cardiomiócitos humanos.

## **8. Limitações do estudo e perspectivas**

O uso de pré-condicionamento com fotobiomodulação, observamos perspectivas promissoras. A fotobiomodulação demonstrou estar associada a

efeitos anti-hipertróficos, anti-fibróticos e anti-antioxidantes, sugerindo potencial como uma abordagem terapêutica para mitigar os efeitos adversos da doxorubicina em cardiomiócitos. A influência da FBM em processos celulares, incluindo a reação ao estresse oxidativo e inflamatório, elementos cruciais na cardiotoxicidade provocada pela doxorubicina, evidenciada nesta pesquisa, pode ser melhor explorada com novas abordagens e parâmetros de irradiação.

Este estudo *in vitro* realizado com cardiomiócitos ventriculares derivados de células-tronco pluripotentes humanas e expostos à doxorubicina destacou os efeitos dessa substância em um contexto específico. No entanto, é crucial mencionar as limitações inerentes a esse tipo de investigação, as quais podem comprometer a generalização dos resultados e a compreensão abrangente dos efeitos da doxorubicina. A variação nas doses do fármaco pode ocasionar distintas reações celulares e, restringir-se a uma única dosagem pode limitar a compreensão abrangente dos efeitos da doxorubicina nos cardiomiócitos ventriculares. Outro ponto limitante foi a utilização do infravermelho nas células de maneira diferente da aplicação *in vivo*. Empregamos parâmetros específicos para cardiomiócitos, mas, se essa técnica fosse utilizada como fonte terapêutica na prática clínica, esses parâmetros provavelmente precisariam ser ajustados.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ewer MS, Ewer SM. Cardiotoxicity of anticancer treatments: what the cardiologist needs to know. *Nat Rev Cardiol.* 2010;7(10):564-75
2. Hajjar LA, Costa IBS da S da, Lopes MACQ, Hoff PMG, Diz MDPE, Fonseca SMR, et al.. Diretriz Brasileira de Cardio-oncologia – 2020. *Arq Bras Cardiol* [Internet]. 2020Nov;115(5):1006–43. Available from: <https://doi.org/10.36660/abc.20201006>
3. Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) [Internet]. Câncer. Folha informativa atualizada em outubro de 2020. [acessado 2023 maio]. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/cancer>
4. Beaglehole R, Bonita R. Global public health: a scorecard. *Lancet.* 2008;372(9654):1988-1996. doi:10.1016/S0140-6736(08)61558-5
5. INCA IN de C. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro; 2022. 162 p
6. Butler D. UN targets top killers. *Nature.* 2011;477(7364):260-261. Published. 2011. doi:10.1038/477260a
7. Bocchi, EA; Guimarães, G; Tarasoutshi, F; et al,. Cardiomyopathy, adult valve disease and heart failure in South America. *Heart.* 2009;95(3):181-9.
8. Bocchi, EA; Braga, FGM; Ayub-Ferreira, SM; et al,. Sociedade Brasileira de Cardiologia. III Diretriz brasileira de insuficiência cardíaca crônica. *Arq Bras Cardiol.* 2009;93(1):3-70
9. Albini A, Pennesi G, Donatelli F, Cammarota R, De Flora S, Noonan DM, Wu AH. Cardiotoxic drugs: clinical monitoring and decision making. *Heart.* 2008;94(11):1503-9.
10. Boussada, Marwa. Etude in vivo et in vitro des effets protecteurs du Sélénium et d'un nouvel analogue de Thioamide contre la cytotoxicité de la Doxorubicine, chez le rat Wistar mâle. 2020.

11. Cruz, M., Duarte-Rodrigues, J.; Campelo, M. Cardiotoxicidade na terapêutica com antraciclinas: estratégias de prevenção. *Revista Portuguesa de Cardiologia*, v. 35, n. 6, p. 359–371, jun. 2016.
12. Gomes, K. M. S. et al. Induced pluripotent stem cells reprogramming: Epigenetics and applications in the regenerative medicine. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 63, n. 2, p. 180–189, fev. 2017.
13. Jorge AL, Pereira ER, Oliveira CS, Ferreira ES, Menon ET, Diniz SN, et al. MicroRNAs: entendendo seu papel como reguladores da expressão gênica e seu envolvimento no câncer. *einstein (São Paulo)*. 2021;19:eRB5996
14. Kalfilil Filho R, Hajjar L, Bacal F, Hoff P, Diz M del P, Galas F. I Diretriz Brasileira de Cardio-Oncologia da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq Bras Cardiol* [Internet]. 2011;96(2):01–52. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2011000700001>
15. Al-Kindi SG, Oliveira GH. Prevalence of Preexisting Cardiovascular Disease in Patients With Different Types of Cancer: The Unmet Need for Onco-Cardiology. *Mayo Clin Proc*. 2016;91(1):81-3.
16. Wu AH. Cardiotoxic drugs: clinical monitoring and decision making. *Heart*. 2008;94(11):1503-9.
17. Wells QS, Lenihan DJ. Reversibility of left ventricular dysfunction resulting from chemotherapy: can this be expected? *Prog Cardiovasc Dis*. 2010;53(2):140-8.
18. Yu Anthony F, Steingart RM, Fuster V. Cardiomyopathy Associated with Cancer Therapy. *J Card Fail*. 2014;20(11):841–52.
19. Dhingra R, Margulets V, Chowdhury SR, Thliveris J, Jassal D, Dorn II GW, et al. Bnip3 mediates doxorubicin-induced cardiac myocyte necrosis and mortality through changes in mitochondrial signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(51):E5537–44.
20. Zucchi R, Danesi R. Cardiac Toxicity of Antineoplastic Anthracyclines. *Curr Med Chem-Anti-Cancer Agents*. 2003;3(2):151–71.

21. Šimůnek T, Štirba M, Popelová O, Adamcová M, Hrdina R, Geršl V. Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep.* 2009;61(1):154–71.
22. Hale JP, Lewis IJ. Anthracyclines: cardiotoxicity and its prevention. *Arch Dis Child.* 1994;71(5):457–62
22. Lipshultz SE, Lipsitz SR, Sallan SE, Dalton VM, Mone SM, Gelber RD, et al. Chronic progressive cardiac dysfunction years after doxorubicin therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 2005;23(12):2629–36.
23. Yu Anthony F, Steingart RM, Fuster V. Cardiomyopathy Associated with Cancer Therapy. *J Card Fail.* 2014;20(11):841–52
24. Gammella E, Maccarinelli F, Buratti P, Recalcati S, Cairo G. The role of iron in anthracycline cardiotoxicity. *Front Pharmacol.* 2014;5
25. Dhingra R, Margulets V, Chowdhury SR, Thliveris J, Jassal D, Dorn II GW, et al. Bnip3 mediates doxorubicin-induced cardiac myocyte necrosis and mortality through changes in mitochondrial signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(51):E5537–44.
26. Thompson KL, Rosenzweig BA, Zhang J, Knapton AD, Honchel R, Lipshultz SE, et al. Early alterations in heart gene expression profiles associated with doxorubicin cardiotoxicity in rats. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010;66(2):303–14.
27. Karhu ST, Kinnunen SM, Tölli M, Välimäki MJ, Szabó Z, Talman V, et al. GATA4-targeted compound exhibits cardioprotective actions against doxorubicin-induced toxicity in vitro and in vivo: establishment of a chronic cardiotoxicity model using human iPSC-derived cardiomyocytes. *Arch Toxicol.* 2020;94:2113–30
28. Delgado GYS, Condé CASR, Santos HFD, Navarro M. Compostos quimioterápicos de ouro: uma visão geral dos complexos anticâncer de Au(I/III) em relação à estrutura do ligante. *Quím Nova.* 2020;43(8):1104–24.
29. Segredo MPF. Papel do estresse oxidativo na cardiotoxicidade aguda e

crônica induzida por Doxorubicina. Tese (Doutorado em Fisiopatologia em Clínica Médica). - Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu. 2017

30. Silva EF e. Um Estudo Teórico da Doxorubicina: Espectroscopia no UV/Vis e Reatividade [Dissertação de mestrado]. Universidade Federal de Sergipe; 2013

31. Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, et al. DOXorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr Med Chem.* 2009.16(25):3267-85. doi: 10.2174/092986709788803312.

32. Guia de protocolos e medicamentos para Tratamento em Oncologia e Hematologia 1o Edição. São Paulo. 2013. Disponível em: <[https://medicalsuite.einstein.br/pratica-medica/guis-e-protocolos/Documents/Guia\\_Oncologia\\_Einstein\\_2013.pdf](https://medicalsuite.einstein.br/pratica-medica/guis-e-protocolos/Documents/Guia_Oncologia_Einstein_2013.pdf)>.

33. Miguel A. Canales. Cardiotoxicidad por adriamicina: Existen alternativas eficaces para su prevención? *Medicina Clínica.* 2010.134(2): 70-71. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2009.09.020>.

34. Ferreira ALA, Matsubara LS, Matsubara BB. Anthracycline – Induced cardiotoxicity. *Cardiovasc Hematol Med Chem.* 2008.6: 278-281.

35. Moura LR, Orpinelli SRT, Sousa JH, et al. Ação do extrato etanólico dacasca do pequi (*Caryocar brasiliense*) na cardiotoxicidade crônica induzida por Doxorubicina em ratos. *Pesq Vet Bras.* 2017.;37(7):713–24. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2017000700011>.

36. Adıyaman MS, Adıyaman ÖA, Dağlı AF, et al. Prevention of DOXorubicin-induced experimental cardiotoxicity by *Nigella sativa* in rats. *Revista Portuguesa de Cardiologia.* 2022.41(2): 99-105. <https://doi.org/10.1016/j.repc.2020.12.015>.

37. Miguel A. Canales. Cardiotoxicidad por adriamicina: Existen alternativas eficaces para su prevención? *Medicina Clínica.* 2010.134(2): 70-71. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2009.09.020>.

38. Miguel A. Canales. Cardiotoxicidad por adriamicina: Existen alternativas eficaces para su prevención? *Medicina Clínica.* 2010.134(2): 70-71. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2009.09.020>.

39. Pontes JCDV, Junior JFG, da Silva GVR, et al. Anatomopathological study of cardiomyopathy induced by DOXorubicin in rats. *Acta Cir. Bras.* 2010. 25 (2): 137- 43.37. Von Hoff, D. D., Layard, M. W., Basa, P, et al . Risk factors for DOXorubicin– induced congestive heart failure. *Ann Intern Med.*1979. 91: 710-17.
40. Singal, P. K., Siveski-Iliskovic, N., Hill, M., et al. Combination therapy with probucol prevents adriamycin – induced cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cell Cardiol.* 1995. 27 (7): 1055-63.
41. Ferrans, V. J., Clark, J. R., Zhang, J.,et al . Pathogenesis and prevention of DOXorubicin cardiomyopathy. *Tsitologiya.* 1997. 39 (9): 28-37.
42. Ferreira ALA, Russell RM, Rocha N, et al. Effect of Lycopene on DOXorubicin-Induced Cardiotoxicity: An Echocardiographic, Histological, and Morphometrical Assessment. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2007. 101: 16–24.
43. Hazari, M. S., Haykal-Coates, N., Winsett, D. W.,et al. Continuous electrocardiogram reveals differences in the short – term cardiotoxic response of wistar – Kyoto and spontaneously hypertensive rats to DOXorubicin. *Toxicol Sci.* 2009.110 (1): 224-34.
44. Breed JG, Zimmerman AN, Dormans JA et al. Failure of the antioxidant vitamin E to protect against adriamycin-induced cardiotoxicity in the rabbit. *Canc Res.* 1980. 40: 2033–2038.
45. Simunek T, Sti`rba M, Popelova O, et al. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep.* 2009. 61: 1734–1140.
46. Van Vleet JF, Ferrans VJ, Weirich WE. Cardiac disease induced by chronic adriamycin administration in dogs and an evaluation of vitamin E and selenium as cardioprotectans. *Am J Pathol.* 1980. 99: 13 – 42.
- 47 Montero P, Flandes-Iparraguirre M, Musquiz S, Araluce MP, Plano D, Sanmartín C, et al. Cells, Materials, and Fabrication Processes for Cardiac Tissue Engineering. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8(955).

48. Gilsbach R, Schwaderer M, Preissl S, Grüning BA, Kranzhöfer D, Schneider P, et al. Distinct epigenetic programs regulate cardiac myocyte development and disease in the human heart in vivo. *Nat Commun.* 2018;9(391)
49. Siedner S, Krüger M, Schroeter M, Metzler D, Roell W, Fleischmann BK, et al. Developmental changes in contractility and sarcomeric proteins from the early embryonic to the adult stage in the mouse heart. *J Physiol.* 2003;548(2):493–505.
50. Karbassi E, Fenix A, Marchiano S, Muraoka N, Nakamura K, Yang X, et al. Cardiomyocyte maturation: advances in knowledge and implications for regenerative medicine. *Nat Rev Cardiol.* 2020;17:341–59.
51. McCain ML, Parker KK. Mechanotransduction: the role of mechanical stress, myocyte shape, and cytoskeletal architecture on cardiac function. *Eur J Physiol.* 2011;462:89–104.
52. Guo Y, Pu WT. Cardiomyocyte Maturation: New Phase in Development. *Circ Res.* 2020;126(8):1086–106
- 53 Horikoshi Y, Yan Y, Terashvili M, Wells C, Horikoshi H, Fujita S, et al. Fatty Acid-Treated Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Human Cardiomyocytes Exhibit Adult Cardiomyocyte-Like Energy Metabolism Phenotypes. *Cells.* 2019;8(9).
54. Jiang Y, Park P, Hong SM, Ban K. Maturation of Cardiomyocytes Derived from Human Pluripotent Stem Cells: Current Strategies and Limitations. *Mol Cells.* 2018;41(7):613–21
55. Ma Y, Bao-Han W, Lv X, Su Y, Zhao X, et al. (2013) MicroRNA-34<sup>a</sup> Mediates the Autocrine Signaling of PAR2-Activating Proteinase and Its Role in Colonic Cancer Cell Proliferation. *PLoS ONE* 8(8): e72383. doi:10.1371/journal.pone.0072383.
56. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843–854.

57. Wightman B, Ha I, Ruvkun G (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75: 855–862
58. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120: 15–20.
59. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.* 2018;47(D1):D155-D62.
59. Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. Regulation of mRNA Translation and Stability by microRNAs. *Annual Review of Biochemistry* 2010 79:1, 351- 379.
60. Oliveira-Carvalho V, Carvalho VO, Silva MM, Guimarães GV, Bocchi EA. MicroRNAs: a new paradigm in the treatment and diagnosis of heart failure? *Arq Bras Cardiol.* 2012;98(4):362-9.
61. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120: 15–20.
62. SZU, H. Hacking the Code for Reverse-Aging. *MOJ Applied Bionics and Biomechanics*, v. 1, n. 4, 10 nov. 2017.63. O'Brien, J; Hayder, H; Zayed, Y; Peng, C. Overview of MicroRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol. Lausanne.* 2018. 9:402.
64. Bartel, DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004. [2] 281:297. doi:10.1016/s0092-8674(04)00045-5.
65. Bohnsack, MT; Czaplinski, K; Gorlich, D. Exportin 5 is a RanGTP- dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs RNA. 2004. [2] 185:191. doi:10.1261/rna.5167604.
66. Yi, R; Qin. Y; Macara ,IG; Cullen, BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 2003. [17] 3011:3016. doi:10.1101/gad.1158803.

67. Bernstein, E; Caudy, AA. Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 2001. [409]363-366. doi:10.1038/35053110.
68. Jonas, S, Izaurralde, E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet*. 2015. [7] 421:433. doi:10.1038/nrg3965.
69. Ameres, SL; Zamore PD. Diversifying microRNA sequence and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013. [8] 475:488. doi:10.1038/nrm3611.
70. Kuang, Z.; Wu, J.; Tan, Y.; Zhu, G.; Li, J.; Wu, M. MicroRNA in the Diagnosis and Treatment of Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Biomolecules* 2023, 13, 568. <https://doi.org/10.3390/biom13030568>.
71. Liu, N; Olson EN. MicroRNA regulatory networks in cardiovascular development. *Dev Cell* 2010. 510– 525.
72. Wang, GK; Zhu, JQ; Zhang, JT; et al., Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J* 2010. 659– 666.
73. Jorge AL, Pereira ER, Oliveira CS, Ferreira ES, Menon ET, Diniz SN, et al. MicroRNAs: entendendo seu papel como reguladores da expressão gênica e seu envolvimento no câncer. *einstein (São Paulo)*. 2021;19:eRB5996..
74. Walayat, A; Yang, M; Xiao, DL; Therapeutic implication of miRNA in human disease. In: Sharad S, Kapur S. *Antisense therapy*. London. 2018. 6. p.1-20.
75. Oliveira-Carvalho V, Carvalho VO, Silva MM, Guimarães GV, Bocchi EA. MicroRNAs: a new paradigm in the treatment and diagnosis of heart failure? *Arq Bras Cardiol*. 2012;98(4):362-9.
76. Beuvink, I; Kolb, FA; Budach, W; et al.,. A novel microarray approach reveals new tissue-specific signatures of known and predicted mammalian microRNAs. *Nucleic Acids Res*. 2007;35 (7):52.
77. Kloosterman, WP; Plasterk, RH. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell*. 2006;11(4):441-50.

78. LEE, S.J. Regulation of muscle mass by myostatin. *Rev. Annu. Cell. Dev. Biol.* n 20, p. 965-971, 2003.
79. Myostatin and muscle mass in chronic diseases Daniele Mendes Guizoni<sup>1</sup> , Aline Regina Ruiz Lima<sup>1</sup> , Paula Felipe Martinez<sup>1</sup> , Ricardo Luiz Damatto<sup>1</sup> , Marcelo Diarcádia Mariano Cezar<sup>1</sup> , Camila Bonomo<sup>1</sup> , Katashi Okoshi<sup>2</sup> , Maeli Dal Pai-Silva<sup>3</sup> , Marina Politi Okoshi<sup>2</sup> \*Recebido da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Botucatu, SP.
80. ARNOLD,H.; DELLA-FERRA, M.A., BAILE, C.A. Review of myostatin history, physiology and applications. *Interation Arch. Bioscience*; p.1024- 1022, 2001.
81. Lee SJ. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu Ver Cell Dev Biol* 2004;20:61-86.
82. Gonzalez-Cadavid NF, Taylor WE, Yarasheski K, et al. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(25):14938-43.
83. Chater-Diehl, EJ; Laufer, BI; Singh, SM. Changes to histone modifications following prenatal alcohol exposure: An emerging picture. *Alcohol*.2017. [60]41-52. doi: 10.1016/j.alcohol.2017.01.005.
84. Trompier,D; Vejux,A; Zarrouk, A; Gondcaille, C;et al., Brain peroxisomes,. *Biochimie*.2014. [98] 102:110.
85. Wirth A. Rho kinase and hypertension. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Dec;1802(12):1276-84. doi: 10.1016/j.bbadis.2010.05.002. Epub 2010 May 9. PMID: 20460153.
86. N. Takahashi, H. Tuiki, H. Saya, K. Kaibuchi Localization of the gene coding for ROCK II/Rho kinase on human chromosome 2p24. *Genomics*, 55 (1999), pp. 235-237
87. ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice *FEBS Lett.*, 392 (1996), pp. 189-193

88. Butler D. UN targets top killers. *Nature*. 2011;477(7364):260-261. Published. 2011. doi:10.1038/477260<sup>a</sup>
89. Beaglehole R, Bonita R. Global public health: a scorecard. *Lancet*. 2008;372(9654):1988-1996. doi:10.1016/S0140-6736(08)61558-5.
90. Bocchi, EA; Guimarães, G; Tarasoutshi, F; et al,. Cardiomyopathy, adult valve disease and heart failure in South America. *Heart*. 2009;95(3):181-9.
91. Bocchi, EA; Braga, FGM; Ayub-Ferreira, SM; et al,. Sociedade Brasileira de Cardiologia. III Diretriz brasileira de insuficiência cardíaca crônica. *Arq Bras Cardiol*. 2009;93(1):3-70.
93. Cai A, Li L, Zhou Y. Pathophysiological effects of RhoA and Rho-associated kinase on cardiovascular system. *J Hypertens*. 2016 Jan;34(1):3-10. doi: 10.1097/HJH.0000000000000768. PMID: 26556565.
94. Walayat, A; Yang, M; Xiao, DL; Therapeutic implication of miRNA in human disease. In: Sharad S, Kapur S. *Antisense therapy*. London. 2018. 6. p.1-20.
95. Urbich, C; Kuehbacher, A; Dimmeler, S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res*. 2008. [4] 581:588. doi:10.1093/cvr/cvn156
96. A. Schindl, H. Merwald, L. Schindl, C. Kaun, J. Wojta, Direct stimulatory effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation, *British Journal of Dermatology*, Volume 148, Issue 2, 1 February 2003, Pages 334–336, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2003.05070.x>
97. Fujihara NA, Hiraki KR, Marques MM. Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. *Lasers Surg Med*. 2006 Apr;38(4):332-6. doi: 10.1002/lsm.20298. PMID: 16526043.
98. Lopes-Martins RA, Marcos RL, Leonardo PS, Prianti AC Jr, Muscará MN, Aimbire F, Frigo L, Iversen VV, Bjordal JM. Effect of low-level laser (Ga-Al-As 655 nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. *J Appl*

Physiol (1985). 2006 Jul;101(1):283-8. doi: 10.1152/jappphysiol.01318.2005. Epub 2006 Apr 20. PMID: 16627677.

99. Albertini R, Villaverde AB, Aimbire F, Bjordal J, Brugnera A, Mittmann J, Silva JA, Costa M. Cytokine mRNA expression is decreased in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg.* 2008 Feb;26(1):19-24. doi: 10.1089/pho.2007.2119. PMID: 18248157.

100. Andrade FSSD, Clark RMO, Ferreira ML. Efeitos da laserterapia de baixa potência na cicatrização de feridas cutâneas. *Rev Col Bras Cir.* [periódico na Internet] 2014;41(2). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/rcbc> 101. Arany PR, Cho A, Hunt JF, Sidhu G, Yu WH, Ramakrishnan R, et al. Photoactivation of Endogenous Latent Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Directs Dental Stem Cell Differentiation for Regeneration. *Sci Transl Med.* 2016;8(358).

101. Hamblin MR. Shining light on the head: Photobiomodulation for brain disorders. *BBA Clin.* 2018;9.

102. . Ganipineni VDP, Gutlapalli SD, Kumar IASK, Monica P, Vagdevi M, Sowrab TS. Exploring the Potential of Energy-Based Therapeutics (Photobiomodulation/Low-Level Laser Light Therapy) in Cardiovascular Disorders: A Review and Perspective. *Cureus.* 2023;15(4).

103. Arany PR, Cho A, Hunt JF, Sidhu G, Yu WH, Ramakrishnan R, et al. Photoactivation of Endogenous Latent Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Directs Dental Stem Cell Differentiation for Regeneration. *Sci Transl Med.* 2016;8(358).

104. Silva T, Mazzilli LEN, Marques MM, Simões A, Rocha EP, Lopes MA, et al. Photobiomodulation Therapy in the Treatment of Oral Mucositis. *J Photochem Photobiol B.* 2020;202.

105. Ferraresi C, Kaunitz J, Fernandes K, Fonseca M, Dantas JL, Bagnato VS. Low-level Laser (light) Therapy (LLLT) on Muscle Tissue: Performance, Fatigue and Repair Benefits. *Lasers Med Sci.* 2015;30(1):295–330

106. Salehpour F, Mahmoudi J, Kamari F, Sadigh-Eteghad S, Rasta SH, Hamblin MR. Brain Photobiomodulation Therapy: A Narrative Review. *Mol Neurobiol*. 2018;55(8):6601–36.
107. AVCI P, Güngör Ş, Aker A. Low-level laser therapy for fat layer reduction: a comprehensive review. *Lasers Surg Med*. 2013;45(6):349–57.
108. De Freitas LF, Da Silva D de FT, Silva DN, Primo FL, Macedo AP, Rodrigues NCO, et al. Effects of low-level laser therapy on human pluripotent stem cells: Proliferation rate, cell cycle progression and apoptosis. *J Photochem Photobiol B*. 2016;164.
109. Mirhosseini M, Shiari R, Motlagh PE, Farivar S. Cerebrospinal Fluid and Photobiomodulation Effects on Neural Gene Expression in Dental Pulp Stem Cells. *J Lasers Med Sci*. 2019;10(Suppl 1):S30–6.
110. Feliciano, R.d.S., Atum, A.L.B., Ruiz, É.G.d.S., Serra, A.J., Antônio, E.L., Manchini, M.T., Silva, J.M.A., Tucci, P.J.F., Nathanson, L., Morris, M., Chavantes, M.C. and Silva Júnior, J.A. (2021), Photobiomodulation Therapy on Myocardial Infarction in Rats: Transcriptional and Posttranscriptional Implications to Cardiac Remodeling. *Lasers Surg Med*, 53: 1247-1257. <https://doi.org/10.1002/lsm.23407>
111. Atum ALB, Silva JAA da, Marques D, Prates RA, Consolim-Colombo FM, Irigoyen Maria Cláudia Costa, et al. Photobiomodulation therapy preconditioning modifies nitric oxide pathway and oxidative stress in human-induced pluripotent stem cell-derived ventricular cardiomyocytes treated with doxorubicin. *Lasers Med Sci*. 2022;37(3):1667–75.
112. Wu Q, Xu Y, Sun X, Zhang X, Liu Z, Zhang W, et al. Low-Level Light Therapy Enhances Cardioprotection via Improved Mitochondrial Function in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Front Physiol*. 2021;12.
113. Silva T, Mazzilli LEN, Marques MM, Simões A, Rocha EP, Lopes MA, et al. Photobiomodulation Therapy in the Treatment of Oral Mucositis. *J Photochem Photobiol B*. 2020;202.

114. Silva TG da, Ribeiro RS, Mencialha AL, Fonseca A de S. Photobiomodulation at molecular, cellular, and systemic levels. *Lasers Med Sci.* 2023;38(1).
115. Gammella E, Maccarinelli F, Buratti P, Recalcati S, Cairo G. The role of iron in anthracycline cardiotoxicity. *Front Pharmacol.* 2014;5.
116. Hanna AD, Lam A, Tham S, Dulhunty AF, Beard NA. Adverse Effects of Doxorubicin and Its Metabolic Product on Cardiac RyR2 and SERCA2A. *Mol Pharmacol.* 2014;86(4):438–49.
117. Chen X, Peng X, Luo Y, You J, Yin D, Xu Q, et al. Quercetin protects cardiomyocytes against doxorubicin-induced toxicity by suppressing oxidativestress and improving mitochondrial function via 14-3-3 $\gamma$ . *Toxicol Mech Methods.* 2019.
118. Haupt LP, Rebs S, Maurer W, Hübscher D, Tiburcy M, Pabel S, et al. Doxorubicin induces cardiotoxicity in a pluripotent stem cell model of aggressive B cell lymphoma cancer patients. *Basic Res Cardiol.* 2022;117(13).
119. Lee JH, Protze S, Laksman Z, Backx PH, Keller GM. Human Pluripotent Stem Cell-Derived Atrial and Ventricular Cardiomyocytes Develop from Distinct Mesoderm Populations. *Cell Stem Cell.* 2017;21(2):179–94.
120. Mummery CL, Zhang J, Ng ES, Elliott DA, Elefanty AG, Kamp TJ. Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: a methods overview. *Circ Res.* 2012;111(3):344–5.
121. Black Box Mini | 20W | Módulo controlador compacto (Compact LED Controller Module). Disponível em: <<https://loja.biolambda.com/black-box-mini>>
122. Horikoshi Y, Yan Y, Terashvili M, Wells C, Horikoshi H, Fujita S, et al. Fatty Acid-Treated Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Human Cardiomyocytes Exhibit Adult Cardiomyocyte-Like Energy Metabolism Phenotypes. *Cells.* 2019;8(9)

123. Silva DCP, Carneiro FD, Almeida KC, Fernandes-Santos C. Papel dos miRNAs na Fisiopatologia das Doenças Cardiovasculares. *Arq. Bras. Cardiol.* 2018;111(5):738-46.
124. Condorelli,G; Latronico, MVG; Cavarretta, E. MicroRNAs in Cardiovascular Diseases: Current Knowledge and the Road Ahead. *Journal of the American College.* 2014. 63:21.
125. Liu, N; Bezprozvannaya, S; Williams, AH; et al,. MicroRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes Dev.* 2008;22(23):3242-54.
126. Leger KJ, Leonard D, Nielson D, de Lemos JA, Mammen PP, Winick NJ. Circulating microRNAs: Potential Markers of Cardiotoxicity in Children and Young Adults Treated With Anthracycline Chemotherapy. *J Am Heart Assoc.* 2017 Apr 4;6(4):e004653. doi: 10.1161/JAHA.116.004653. PMID: 28377429; PMCID: PMC5532993..
127. Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature.* 2005;436(7048):214-20
128. Carmean CM, Bobe AM, Yu JC, Volden PA, Brady MJ. Refeeding-induced brown adipose tissue glycogen hyper-accumulation in mice is mediated by insulin and catecholamines. *PLoS One.* 2013 Jul 4;8(7):e67807. doi: 10.1371/journal.pone.0067807. PMID: 23861810; PMCID: PMC3701606.
129. Sayed, D; Hong, C; Chen, IY; et al,. MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circ Res.*2007;100(3):416-24.
130. Cheung YF, Li VW, Lai CT, Shin VY, Keung W, Cheuk DK, Kwong A, Li RA, Chan GC. Circulating high-sensitivity troponin T and microRNAs as markers of myocardial damage during childhood leukaemia treatment. *Pediatr Res.* 2021 Apr;89(5):1245-1252. doi: 10.1038/s41390-020-1049-5. Epub 2020 Jul 7. PMID: 32634817.
131. Tatsuguchi M, Seok HY, Callis TE, Thomson JM, Chen JF, Newman M, Rojas M, Hammond SM, Wang DZ. Expression of microRNAs is dynamically

regulated during cardiomyocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 2007 Jun;42(6):1137-41. doi: 10.1016/j.yjmcc.2007.04.004. Epub 2007 Apr 14. PMID: 17498736; PMCID: PMC1934409.

132. Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature.* 2008;456(7224):980-4

133. Silva DCP da, Carneiro FD, Almeida KC de, Fernandes-Santos C. Role of miRNAs on the Pathophysiology of Cardiovascular Diseases. *Arq Bras Cardiol [Internet].* 2018Nov;111(5):738

134. Tony H, Meng K, Wu B, Yu A, Zeng Q, Yu K, et al. MicroRNA-208a Dysregulates Apoptosis Genes Expression and Promotes Cardiomyocyte Apoptosis during Ischemia and Its Silencing Improves Cardiac Function after Myocardial Infarction. *Mediators Inflamm.* 2015;2015 Nov 25:479123.

135. Shieh JT, Huang Y, Gilmore J, Srivastava D. Elevated miR-499 levels blunt the cardiac stress response. *PLoS One.* 2011;6(5):19481.

136. F Rodrigues, M Bexiga, A Varanda, M Mano, Dissection of the role of microRNAs in cardiac fibrosis through functional genomics screenings, *Cardiovascular Research*, 118, 1, 2022. cvac066.150, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvac066.150>

137. Oliveira-Carvalho V, Carvalho VO, Silva MM, Guimarães GV, Bocchi EA. MicroRNAs: um novo paradigma no tratamento e diagnóstico da insuficiência cardíaca?. *Arq Bras Cardiol.* 2012Apr;98(4):362–70. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2012000400011>

138. Duisters RF, Tijssen AJ, Schroen B, Leenders JJ, Lentink V, van der Made I, et al. miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor: implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling. *Circ Res.* 2009;104(2):170-8.







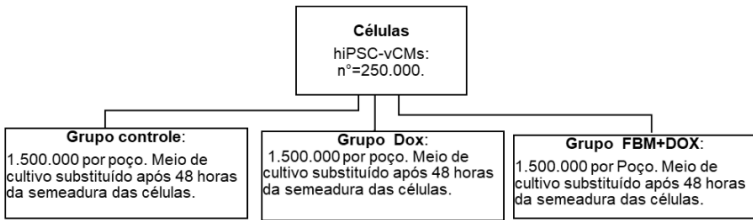

139. Carè A, Catalucci D, Felicetti F, Bonci D, Addario A, Gallo P, et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med.* 2007;13(5):613-8.

140. Van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(48):18255-60
141. Liu N, Bezprozvannaya S, Williams AH, Qi X, Richardson JA, Bassel-Duby R, et al. microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes Dev*. 2008;22(23):3242-54.
142. T. Ishizaki, M. Maekawa, K. Fujisawa, K. Okawa, A. Iwamatsu, A. Fujita, N. Watanabe, Y. Saito, A. Kakizuka, N. Morii, S. Narumiya The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase.
143. Zou Y, Liu W, Zhang J, Xiang D. miR-153 regulates apoptosis and autophagy of cardiomyocytes by targeting Mcl-1. *Mol Med Rep*. 2016 Jul;14(1):1033-9. doi: 10.3892/mmr.2016.5309. Epub 2016 May 19. PMID: 27220418.
144. Xie Y, Wang Q, Gao N, Wu F, Lan F, Zhang F, Jin L, Huang Z, Ge J, Wang H, Wang Y. MicroRNA-10b Promotes Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocyte Proliferation via Novel Target Gene LATS1. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2020 Mar 6;19:437-445. doi: 10.1016/j.omtn.2019.11.026. Epub 2019 Nov 29. PMID: 31902743; PMCID: PMC6948266.
145. Shaharyar, M.A.; Bhowmik, R.; Al-Abbasi, F.A.; AlGhamdi, S.A.; Alghamdi, A.M.; Sarkar, A.; Kazmi, I.; Karmakar, S. Vaccine Formulation Strategies and Challenges Involved in RNA Delivery for Modulating Biomarkers of Cardiovascular Diseases: A Race from Laboratory to Market. *Vaccines* 2023, 11, 241. <https://doi.org/10.3390/vaccines11020241>
146. Boon, R., Iekushi, K., Lechner, S. et al. MicroRNA-34a regulates cardiac ageing and function. *Nature* 495, 107–110 (2013). <https://doi.org/10.1038/nature11919>
147. Tay, Y.; Zhang, J.; Thomson, A.M.; Lim, B.; Rigoutsos, I. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature* 2008, 455, 1124–1128

148. Wu YH, Zhao H, Zhou LP, Zhao CX, Wu YF, Zhen LX, Li J, Ge DX, Xu L, Lin L, Liu Y, Liang DD, Chen YH. miR-134 Modulates the Proliferation of Human Cardiomyocyte Progenitor Cells by Targeting Meis 2. *Int J Mol Sci.* 2015 Oct 23;16(10):25199-213. doi: 10.3390/ijms161025199. PMID: 26512644; PMCID: PMC4632798
149. Lee EK, Lee MJ, Abdelmohsen K, Kim W, Kim MM, Srikantan S, Martindale JL, Hutchison ER, Kim HH, Marasa BS, Selimyan R, Egan JM, Smith SR, Fried SK, Gorospe M. miR-130 suppresses adipogenesis by inhibiting peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression. *Mol Cell Biol.* 2011.31(4):626-38. doi: 10.1128/MCB.00894-10.
150. Long X, Huang Y, He J, Zhang X, Zhou Y, Wei Y, Tang Y, Liu L. Upregulation of miR 335 exerts protective effects against sepsis induced myocardial injury. *Mol Med Rep.* 2021 24(5):806. doi: 10.3892/mmr.2021.12446.
151. Wang Y, Wang H, Ding Y, Li Y, Chen S, Zhang L, Wu H, Zhou J, Duan K, Wang W, et al. N-peptide of vMIP-II reverses paclitaxel-resistance by regulating miRNA-335 in breast cancer. *Int J Oncol.* 2017;51:918–930.
152. Bai XY, Ma Y, Ding R, Fu B, Shi S, Chen XM. miR-335 and miR-34a Promote renal senescence by suppressing mitochondrial antioxidative enzymes. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22:1252–1261. doi: 10.1681/ASN.2010040367.
153. Liu Y, Lai P, Deng J, Hao Q, Li X, Yang M, Wang H, Dong B. Micro-RNA335-5p targeted inhibition of sKlotho and promoted oxidativestress-mediated aging of endothelial cells. *Biomark Med.* 2019;13:457–466.

## 10. ANEXOS

### 10.1 Checklist para ensaios *in vitro*

CHECKLIST EM CULTURA CELULAR 1/4													
TÓPICO	Nº	DESCRIÇÃO	PG										
Desenho do estudo	1	<p>Estudo experimental <i>in vitro</i> conduzido com cardiomiócitos ventriculares humanos, derivados de células-tronco pluripotentes, previamente submetidos à pré-condicionamento com fotobiomodulação e posteriormente expostos à doxorubicina.</p> <p style="text-align: center;"><b>GRUPOS EXPERIMENTAIS</b></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 30%;">Grupos amostrais</th> <th style="width: 30%;">Exposição recebido(s)</th> <th style="width: 40%;">Análises realizadas</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">Grupo Controle</td> <td> <ul style="list-style-type: none"> <li>HiPSC-vCMs não foram expostas a DOX e a FBM;</li> <li>Irradiados com lâmpada padrão branca por 500seg;</li> <li>Adição de soro fisiológico estéril.</li> </ul> </td> <td rowspan="3" style="text-align: center; vertical-align: middle;">Análise de toxicidade, extração de RNA total e análise da expressão de microRNAs</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Grupo DOX </td> <td> <ul style="list-style-type: none"> <li>HiPSC-vCMs adição de 2µM de DOX por 24h.</li> </ul> </td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Grupo FBM+DOX </td> <td> <ul style="list-style-type: none"> <li>HiPSC-vCMs pré-condicionamento com FBM (500 segundos)</li> <li>Adição 2µM de DOX.</li> </ul> </td> </tr> </tbody> </table> <p><b>Quadro 4-</b> grupos amostrais, tratamentos recebidos e análises realizadas. <b>Legenda:</b> HiPSC-vCMs: cardiomiócitos ventriculares derivados de células-tronco pluripotentes humanas; DOX: doxorubicina; FBM: fotobiomodulação; mRNA: RNA mensageiro; µM: Micromolar. Fonte: elaborado pelo autor.</p> <p><b>Procedência:</b> HiPSC-VCMs criopreservadas, adquiridas da PluriCell Biotech.</p> <p><b>Procedência das células:</b> Linhagem celular.</p> <p><b>Distribuição de células nos diferentes grupos experimentais:</b> 250.000 células por poço, em uma placa de microplacas de 6 poços.</p>	Grupos amostrais	Exposição recebido(s)	Análises realizadas	Grupo Controle	<ul style="list-style-type: none"> <li>HiPSC-vCMs não foram expostas a DOX e a FBM;</li> <li>Irradiados com lâmpada padrão branca por 500seg;</li> <li>Adição de soro fisiológico estéril.</li> </ul>	Análise de toxicidade, extração de RNA total e análise da expressão de microRNAs	Grupo DOX 	<ul style="list-style-type: none"> <li>HiPSC-vCMs adição de 2µM de DOX por 24h.</li> </ul>	Grupo FBM+DOX 	<ul style="list-style-type: none"> <li>HiPSC-vCMs pré-condicionamento com FBM (500 segundos)</li> <li>Adição 2µM de DOX.</li> </ul>	<b>38-40</b>
		Grupos amostrais	Exposição recebido(s)	Análises realizadas									
Grupo Controle	<ul style="list-style-type: none"> <li>HiPSC-vCMs não foram expostas a DOX e a FBM;</li> <li>Irradiados com lâmpada padrão branca por 500seg;</li> <li>Adição de soro fisiológico estéril.</li> </ul>	Análise de toxicidade, extração de RNA total e análise da expressão de microRNAs											
Grupo DOX 	<ul style="list-style-type: none"> <li>HiPSC-vCMs adição de 2µM de DOX por 24h.</li> </ul>												
Grupo FBM+DOX 	<ul style="list-style-type: none"> <li>HiPSC-vCMs pré-condicionamento com FBM (500 segundos)</li> <li>Adição 2µM de DOX.</li> </ul>												
Tamanho da amostra	2a		<b>38-40</b>										
	2b	Atum, A.L.B., da Silva, J.A.A., Marques, D. et al. Photobiomodulation therapy preconditioning modifies nitric oxide pathway and oxidative stress in human-induced pluripotent stem cell-derived ventricular cardiomyocytes treated with doxorubicin. <i>Lasers Med Sci</i> 37, 1667–1675 (2022). <a href="https://doi-org.ez345.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s10103-021-03416-9">https://doi-org.ez345.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s10103-021-03416-9</a> .	<b>38</b>										
Critérios de controle	3	Serão utilizadas culturas com 90% células viáveis e em confluência de 80%. O monitoramento das células será realizado a cada 48h.	<b>38</b>										
Cegamento	4	A fase envolvendo a organização dos grupos e a irradiação não foi realizada de forma cega. No entanto, o procedimento de PCR foi executado em regime cego.	-										
Desfechos	5	<p><b>Análise de Toxicidade celular</b></p> <p><b>Expressão de miRNAs:</b> miR-1, miR-9, miR-10a e b, miR-21, miR-34a, miR-130a, miR-133, miR-134, miR-153, miR-208, miR-335, miR-499.</p> 	<b>37</b>										

## CHECKLIST EM CULTURA CELULAR 2/4

### Condições de cultivo:

- Os hiPSC-vCMs foram cultivadas em placas revestidas com Geltrex, com 1 ml de Meio de plaqueamento;
- Quarenta e oito horas após a semeadura, o meio foi substituído por meio de manutenção de cardiomiócitos;
- As hiPSC-vCMs foram incubadas a 37°C em uma incubadora umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>.

Vale ressaltar que as células utilizadas na pesquisa apresentam diferenças morfológicas quando comparadas aos cardiomiócitos humanos maduros, o que foi descrito por Karbassi et al.

Karbassi E, Fenix A, Marchiano S, Muraoka N, Nakamura K, Yang X, et al. Cardiomyocyte maturation: advances in knowledge and implications for regenerative medicine. Nat Rev Cardiol. 2020;17:341–59.

### Pré-condicionamento com terapia de fotobiomodulação (FBM):

PRÉ-CONDICIONAMENTO COM TERAPIA DE FOTOBIMODULAÇÃO (FBM)	
DISPOSITIVO	LED
LUZ	VERMELHA
COMPRIMENTO DE ONDA	660nm ± 10nm
TEMPO	500 SEGUNDOS POR POÇO
IRRADIÂNCIA	10 mW/cm <sup>2</sup>
DOSE TOTAL	5 J/cm <sup>2</sup>
MODO DE OPERAÇÃO	CONTÍNUA (CW)
DISTÂNCIA	14mm
OUTRAS INFORMAÇÕES	<ul style="list-style-type: none"> <li>• UMA ÚNICA SESSÃO DE TRATAMENTO;</li> <li>• AMBIENTE PARCIALMENTE ESCURO DURANTE A IRRADIAÇÃO;</li> <li>• AUSÊNCIA DE OUTRAS FONTES DE LUZ INTERFERENTES;</li> <li>• MEIO DE CULTURA REMOVIDO ANTES DA IRRADIAÇÃO;</li> </ul>

**EXPOSIÇÃO À DOXORRUBICINA**

- ADIÇÃO DE 2 M DE DOX AO MEIO.
- CENTRIFUGAÇÃO 500XG POR 10 MINUTOS A 4°C.
- REMOÇÃO DO LÍQUIDO DO MEIO.
- CONGELAMENTO DAS CÉLULAS EM NITROGÊNIO LÍQUIDO.
- ARMAZENAMENTO A -80°C PARA ANÁLISE POR QPCR.

### Expressão microRNA por PCR quantitativo:

- Extração de microRNA;
- Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) em tempo real - qPCR:

miR-1, miR-9, miR-10a e b, miR-21, miR-34a, miR-130a, miR-133, miR-134, miR-153, miR-208, miR-335, miR-499.

- Análise de Dados

**Procedimentos experimentais**

**6**

**39-44**

**Métodos estatísticos**

**7**

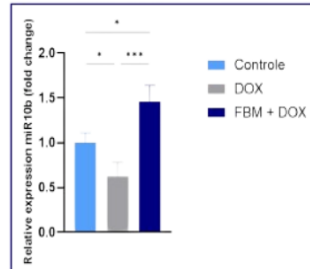
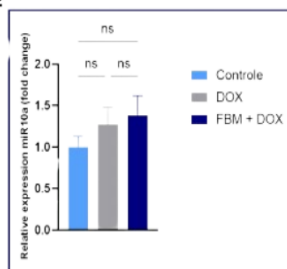
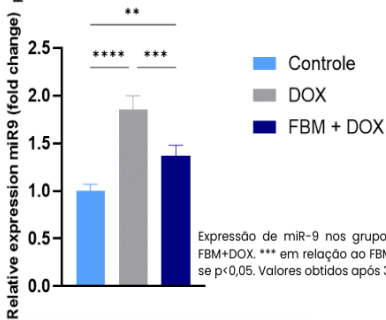
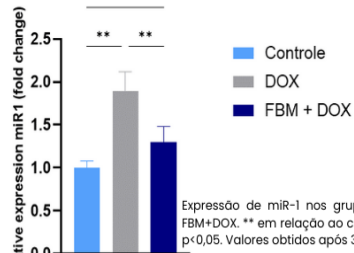
**46**

Os dados foram expressos como média erro padrão . O software Prism 10, foi utilizado para a análise estatística. Para comparações entre grupos foi realizado One Way ANOVA (para amostras independentes com distribuição paramétrica dos dados) com teste pós-hoc de Tukey Para qPCR, os ensaios foram conduzidos em duplicata repetidos por três vezes, os dados foram analisados pelo teste t de Student não pareado. A significância estatística foi definida como ps0,05

## CHECKLIST EM CULTURA CELULAR 3/4

### Resultados

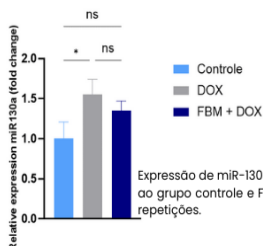
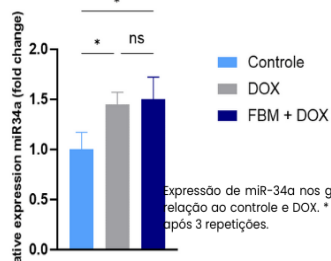
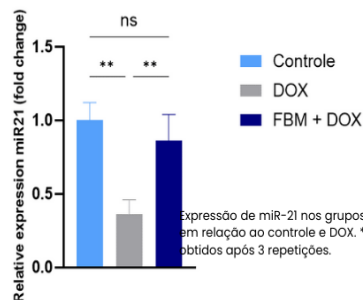
8



a

b

Expressão de miR-10a e miR-10b nos grupos Controle, DOX e FBM+DOX. Figura A : ns em relação ao grupo controle, FBM+DOX e DOX. Figura b: \* em relação ao controle e DOX. \* em relação ao grupo controle e FBM+DOX. \*\*\* em relação ao grupo DOX e FBM+DOX. Significativo se  $p < 0,05$ . Valores obtidos após 3 repetições.

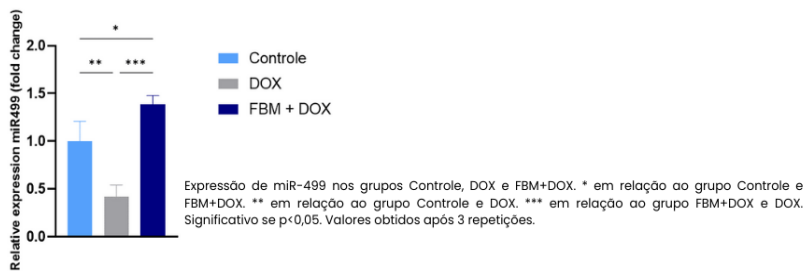
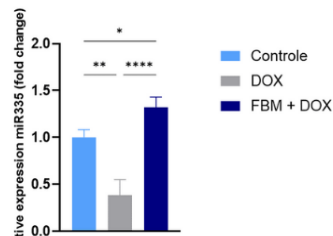
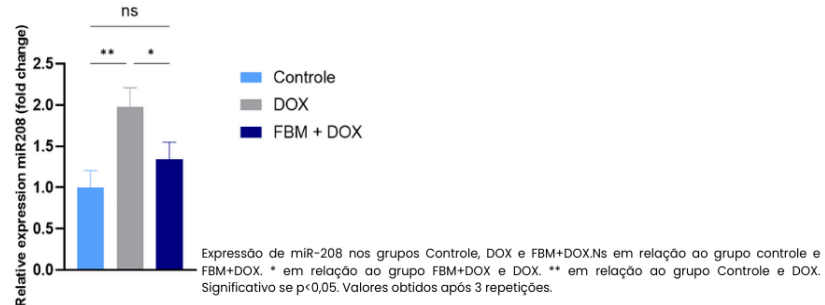
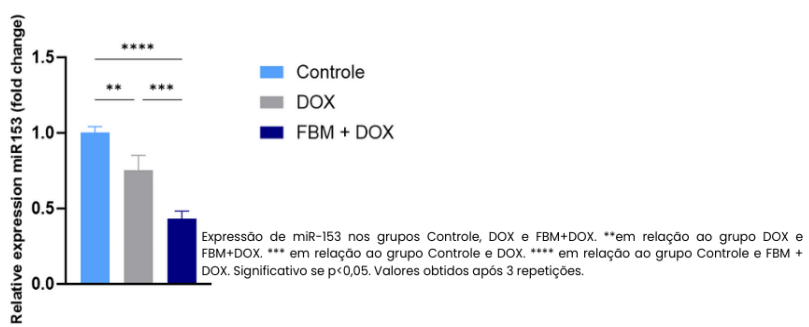
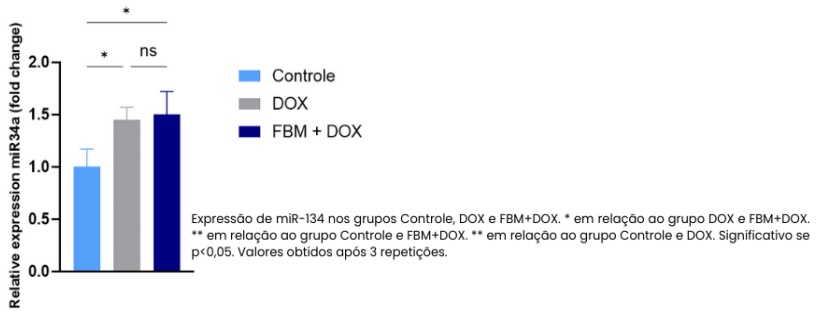
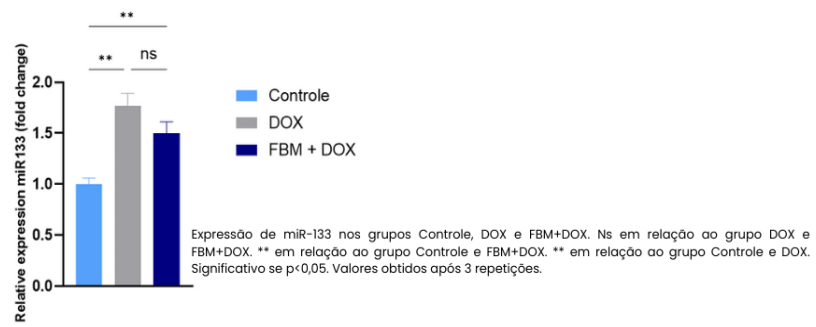


46-54

## CHECKLIST EM CULTURA CELULAR 4/4

RESULTADOS

8



46-54