

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Carlos Henrique Santos Dias

Impacto do câncer de pulmão na função cardíaca

São Paulo
2025

Carlos Henrique Santos Dias

Impacto do câncer de pulmão na função cardíaca

Versão original

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Cardiologia

Orientador:
Prof. Dr. Carlos Eduardo Negrão

São Paulo
2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Dias, Carlos Henrique Santos

Impacto do câncer de pulmão na função cardíaca / Carlos
Henrique Santos Dias; Carlos Eduardo Negrão, orientador. --
São Paulo, 2025.

Tese (Doutorado) -- Programa de Cardiologia. Faculdade
de Medicina da Universidade de São Paulo, 2025.

1.Câncer de pulmão 2.Disfunção cardíaca 3.Sinalização
do Cálcio 4.Camundongos 5.Western Blotting I.Negrão,
Carlos Eduardo, orient. II.Título

USP/FM/DBD-499/25

Responsável: Daniela Amaral Barbosa, CRB-8 7533

Carlos Henrique Santos Dias

Impacto do câncer de pulmão na função cardíaca

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, estendo minha profunda gratidão aos meus pais. Apesar de não terem tido a oportunidade de concluir o ensino formal, eles me ensinaram valores essenciais como respeito e gratidão, pilares que me acompanharam ao longo desta jornada acadêmica.

Ao meu orientador, expresso minha eterna gratidão. Por meio de seu exemplo de dedicação à pesquisa e aos alunos, ele foi fundamental para o meu desenvolvimento e para a conclusão deste trabalho.

À Úrsula Urias, nenhuma palavra seria suficiente para descrever minha gratidão. Sua dedicação, suporte incondicional e colaboração foram cruciais; sem sua ajuda, este projeto seria significativamente mais difícil de ser realizado.

Agradeço também a toda a equipe do InCor, que sempre me tratou com respeito e me ofereceu a assistência necessária. Um agradecimento especial a Sandra, Elaine e Monica, pelo carinho e apoio contínuos.

Meu reconhecimento se estende a Sidnei e Luana, da coordenação da pós-graduação, por seu trabalho exemplar, prontidão e cordialidade na resolução de dúvidas e na assistência aos alunos.

Agradeço também ao Laboratório de Biologia Molecular da Escola de Educação Física e Esporte por todo o suporte e carinho com que me acolheram.

Ao professor Júlio Ferreira e Lisley do ICB, meu reconhecimento pela parceria fundamental em meu projeto.

Agradeço ainda a Ursula Soci, por sua constante disponibilidade para ajudar; a Raphaela, por me acolher em sua pesquisa e confiar na minha capacidade para executar as tarefas necessárias.

A Camila e à professora Vera, meu agradecimento pelo suporte técnico e orientação na área de ecocardiografia.

À CAPES, minha sincera gratidão pela bolsa de estudos. Esse apoio financeiro é vital e permite que pesquisadores como eu dediquem seu tempo integralmente à produção científica.

Por fim, agradeço a todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho. Aos que torceram por mim, que compreenderam minha ausência em momentos sociais e que me apoiaram durante este período de dedicação, meu mais profundo e sincero obrigado.

*“Se vi mais longe foi por estar sobre ombros de gigantes!”
(Isaac Newton)*

RESUMO

Dias CHS. Impacto do câncer de pulmão na função cardíaca [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2025.

Introdução: O câncer pode ser identificado como o conjunto de doenças com características de crescimento celular anormal. Sua incidência e taxa de letalidade são elevadas, atingindo o topo do ranking das principais causas de morte no mundo. Embora o câncer de pulmão tenha uma incidência menor que outros tipos de câncer, sua agressividade e letalidade o colocam entre as principais causas de morte. Observações recentes sugerem que o câncer pode provocar efeitos sistêmicos adversos, contudo, esse é um ponto que ainda precisa ser mais bem documentado.

Objetivos: Investigamos se o câncer de pulmão provocou alterações na morfologia, função cardíaca e modulação de cálcio no cardiomiócito. **Métodos:** Foram estudados camundongos machos C57BL/6, randomizados em dois grupos: A) Controle saudável; e B) Câncer, com implante de células tumorais LLC1 (5×10^6) no tecido subcutâneo do flanco direito. A avaliação da função cardíaca foi conduzida utilizando-se ecocardiografia, sendo empregadas imagens de *speckle-tracking* nos planos radial, longitudinal e circunferencial. A capacidade física foi avaliada por um teste progressivo máximo em esteira. A quantificação das proteínas envolvidas na via de sinalização do cálcio foi realizada utilizando a metodologia de Western Blot. O transiente de cálcio foi avaliado por fluorescência. **Resultados:** Os camundongos com câncer apresentaram uma redução significativa na capacidade física, manifestada pela diminuição da distância percorrida ($p < 0,001$), da velocidade ($p < 0,001$) e do tempo de corrida no teste de esteira ($p < 0,001$). A avaliação ecocardiográfica revelou uma diminuição significativa na fração de ejeção do ventrículo esquerdo ($p = 0,007$) no grupo com câncer. Em relação ao peso dos órgãos, houve um aumento significativo no baço ($p < 0,001$), fígado ($p < 0,001$) e pulmões ($p < 0,001$) no grupo com câncer. No nível molecular, o grupo com câncer apresentou um aumento significativo na expressão do trocador sódio/cálcio (NCX) ($p = 0,009$) e fosfolambam (PLB) ($p = 0,039$) no cardiomiócito. A relação SERCA2a/PLB e SERCA2a/NCX também foi reduzida ($p = 0,004$ e $p = 0,023$, respectivamente). Além disso, a diminuição do transiente de cálcio foi observada em vários parâmetros: níveis basais de cálcio a 0,5Hz ($p < 0,001$) e 3,0Hz ($p < 0,001$), velocidade de liberação de cálcio a 0,5Hz ($p < 0,001$) e 3,0Hz ($p < 0,001$), amplitude do sinal de cálcio a 0,5Hz ($p = 0,050$) e 3,0Hz ($p < 0,001$), e velocidade de recaptação de cálcio a 0,5Hz ($p < 0,001$) e 3,0Hz ($p < 0,001$). **Conclusão:** O câncer de pulmão provoca alterações significativas no peso de órgãos, na capacidade física e na função cardíaca, o que é associada a alterações na expressão de proteínas das vias de cálcio e no transiente de cálcio do cardiomiócito.

Palavras-chave: Câncer de pulmão. Disfunção cardíaca. Sinalização do Cálcio. Camundongos. Western Blotting.

ABSTRACT

Dias CHS. Impact of lung cancer on cardiac function [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2025.

Introduction: Cancer can be identified as a group of diseases characterized by abnormal cell growth. Its high incidence and fatality rates place it at the top of the ranking of the leading causes of death worldwide. Although lung cancer has a lower incidence than other types of cancer, its aggressiveness and lethality make it one of the main causes of death among all diseases. Recent observations from our laboratory suggest that cancer can cause adverse systemic effects; however, this is a point that still needs to be better documented. **Objectives:** We investigated whether lung cancer caused changes in morphology, cardiac function, and calcium modulation in the cardiomyocyte. **Methods:** Male C57BL/6 mice were randomized into two groups: A) Healthy control; and B) Cancer, with the subcutaneous implantation of LLC1 tumor cells in the right flank. Cardiac function was assessed using echocardiography, employing speckle-tracking imaging in the radial, longitudinal, and circumferential planes. Physical capacity was assessed by a maximal progressive exercise test on a treadmill. Quantification of proteins involved in the calcium signaling pathway was performed using Western Blot methodology. The calcium transient was evaluated by fluorescence. **Results:** Cancer mice showed a significant reduction in physical capacity, manifested by a decrease in running distance ($p<0.001$), speed ($p<0.001$), and running time on the treadmill test ($p<0.001$). Echocardiographic evaluation revealed a significant decrease in left ventricular ejection fraction ($p=0.007$) in the cancer group. Regarding organ weight, there was a significant increase in the spleen ($p<0.001$), liver ($p<0.001$), and lungs ($p<0.001$) in the cancer group. At the molecular level, the cancer group showed a significant increase in the expression of sodium/calcium exchanger (NCX) ($p=0.009$) and Phospholamban (PLB) ($p=0.039$) in the cardiomyocyte. The SERCA2a/PLB and SERCA2a/NCX ratios were also reduced ($p=0.004$ and $p=0.023$, respectively). Furthermore, a decrease in the calcium transient was observed in several parameters: basal calcium levels at 0.5Hz ($p<0.001$) and 3.0Hz ($p<0.001$), calcium release speed at 0.5Hz ($p<0.001$) and 3.0Hz ($p<0.001$), calcium signal amplitude at 0.5Hz ($p=0.050$) and 3.0Hz ($p<0.001$), and calcium reuptake speed at 0.5Hz ($p<0.001$) and 3.0Hz ($p<0.001$). **Conclusion:** Lung cancer caused significant changes in organ weight, physical capacity, and cardiac function, which were associated with alterations in the expression of calcium pathway proteins and in the cardiomyocyte's calcium transient.

Descriptors: Lung cancer. Cardiac dysfunction. Calcium signaling. Mice. Western Blotting.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho experimental	33
Figura 2 Peso corporal de camundongos saudáveis e camundongos inoculados com células de câncer de pulmão durante as semanas de estudo	42
Figura 3. Peso corporal de camundongos saudáveis e camundongos inoculados com células de câncer de pulmão na pré eutanásia	43
Figura 4. Peso do baço, fígado e pulmões em camundongos inoculados com células de câncer de pulmão e camundongos saudáveis	44
Figura 5. Capacidade física em camundongos inoculados com células de câncer de pulmão e camundongos saudáveis	46
Figura 6. Fração de ejeção em camundongos inoculados com células de câncer de pulmão e camundongos saudáveis	49
Figura 7. Níveis basais de cálcio com estimulação de 0.5 e 3.0Hz	51
Figura 8. Velocidade de liberação de cálcio com estimulação de 0.5 e 3.0Hz.	51
Figura 9. Amplitude de cálcio com estimulação de 0.5 e 3.0Hz.	52
Figura 10. Velocidade de absorção de cálcio com estimulação de 0.5 e 3.0Hz	52
Figura 11. Tempo para alcançar 50% do encurtamento máximo do cardiomiócito com estimulações de 0.5Hz	53
Figura 12. Diâmetro do cardiomiócito em camundongos com câncer de pulmão e camundongos saudáveis.....	56
Figura 13. Área de fração de colágeno em camundongos com câncer de pulmão e camundongos saudáveis.....	56
Figura 14. Quantificação de proteínas Fosfolambam e NCX reguladoras do cálcio no coração.....	57
Figura 15. Quantificação de proteínas p-PLB e SERCA, reguladoras do cálcio no coração.....	58
Figura 16. Relação de proteínas SERCA/PLB e SERCA/NCX, reguladoras do cálcio no coração.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Peso corporal de camundongos saudáveis e camundongos inoculados com células de câncer de pulmão.	42
Tabela 2. Peso corporal de camundongos saudáveis e camundongos inoculados com células de câncer de pulmão na pré eutanásia.	43
Tabela 3. Peso dos órgãos em camundongos saudáveis e camundongos inoculados com células de câncer de pulmão.	43
Tabela 4. Capacidade física em camundongos inoculados com células de câncer de pulmão e camundongos saudáveis.	45
Tabela 5. Morfologia e função cardíaca em camundongos inoculados com células de câncer de pulmão e camundongos saudáveis.	47
Tabela 6. Níveis basais de cálcio, velocidade de liberação de cálcio, amplitude do sinal de cálcio e velocidade de recaptação de cálcio e níveis de cálcio no cardiomiócito em camundongos inoculados com células de câncer de pulmão e camundongos saudáveis.	50
Tabela 7. Comprimento do sarcômero, encurtamento do sarcômero, velocidade de encurtamento do sarcômero e tempo para atingir 50% da contração máxima do sarcômero.	53
Tabela 8 Encurtamento do cardiomiócito, velocidade de contração do cardiomiócito e tempo para atingir 50% da contração máxima do cardiomiócito	54
Tabela 9. Parâmetros avaliados através da microscopia óptica para variáveis como área de fração de colágeno e diâmetro do cardiomiócito.	55

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

Ca ²⁺	Cálcio
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
DDFVE	Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo
DDFVE	Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo
DDR2	Domínio Receptor de Discodina 2
DSFVE	Diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo
DSFVE	diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo
E/A	Relação onda E/Onda A
E/e'	Relação Onda E/ Velocidade de relaxamento miocárdico do anel mitral na fase de enchimento ventricular precoce
e'	Velocidade de relaxamento miocárdico do anel mitral na fase de enchimento ventricular precoce
EC Circ	Eixo curto circunferencial
ECC	Eixo curto circunferencial
ECO	Avaliação ecocardiográfica
ECR	Eixo curto radial
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetraacético
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
EL	Eixo longo
ELL	Eixo longo longitudinal
ELR	Eixo longo radial
FC	Frequência Cardíaca
FE	Fração de ejeção
FGFR1	Receptor do Fator de Crescimento de Fibroblastos 1
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FS	Fração de encurtamento
GDF15	Fator de Crescimento e Diferenciação 15
HER2	Receptor Epidérmico Humano 2
Hz	Hertz (Frequência)
IQR	Intervalo InterQuartil
IL-6	Interleucina 6
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPM	Índice de performance miocárdica
KRAS	Gene Rat sarcoma de Kirsten
LLC1	Carcinoma Pulmonar de Lewis 1
MassaVE	massa do ventrículo esquerdo
MET	Fator de transição epitelial E mesenquimal

Mv des. E	Tempo de desaceleração da onda E
NCX	Trocador Cálcio-Sódio
Onda A	Pico de velocidade do fluxo transmitral durante a contração atrial
Onda E	Velocidade do fluxo mitral na fase de enchimento ventricular precoce
OXPPOS	Fosforilação Oxidativa
PLB	Fosfolambam
PNM	Palpável não mensurável
P-PLB	Fosfolambam Fosforilado
PTEN	Homólogo de Fosfatase e Tensina
SERCA2a	Reticulo sarcoplasmático de cálcio 2 ATPase
SIV	Septo Interventricular
SR	Strain Rate
TBS-T	Solução salina tamponada com Tris com Tween
TCI	Tempo de contração isovolumétrica
TE	Tempo de ejeção
TEMax	Teste de esforço máximo
TFEB	Fator de Transcrição EB
TFEB nuclear	Fator de Transcrição EB nuclear
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TRIVc	Tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido pelo peso
VDF	Volume diastólico final
VE	Ventrículo esquerdo
VSF	volume sistólico final

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 - Câncer, Incidência e Mortalidade.....	17
1.2 - Câncer de Pulmão	18
1.3 - Câncer e Doença Cardiovascular	22
1.4 - Alterações Cardiovasculares Provocadas pelo Tratamento do Câncer	27
2. JUSTIFICATIVA.....	30
3. OBJETIVOS.....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Modelo experimental e cultura de células	31
4.2 Protocolo experimental.....	32
4.3 Procedimentos e Medidas.....	33
4.3.1 Mensuração do Crescimento Tumoral por Paquímetro Digital	33
4.3.2 Capacidade física avaliada pelo teste em esteira.....	33
4.3.3 Avaliação da Função e Morfologia Cardíaca por Ecocardiografia ..	34
4.3.4 Avaliação da Morfologia e Função Cardíaca Através da Análise de <i>Speckle-Tracking</i>	35
4.3.5 Isolamento de cardiomiócitos de camundongos adultos	36
4.3.6 Encurtamento e realongamento de cardiomiócitos.....	37
4.3.7 Transiente de cálcio.....	37
4.3.8 Eutanásia e coleta do material biológico	38
4.3.9 Análises histológicas	38
4.3.10 Extração proteica e análise de <i>Western Blot</i>	39
4.4 Cálculo amostral e análise estatística	40
5. RESULTADOS.....	41
5.1 Peso Corporal	41
5.2 Peso dos órgãos	43

5.3 Capacidade física.....	45
5.4 Morfologia e Função Cardíaca	46
5.5 Transiente de Cálcio	50
5.6 Análise histológica.....	55
5.7 Alterações Moleculares Cardíacas.....	57
6. DISCUSSÃO	59
6.5 Limitações	65
6.6 Perspectivas.....	65
7. Conclusões	66
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Câncer, Incidência e Mortalidade

Câncer é o termo genérico para um conjunto de doenças de origem genética, etiologia heterogênea, multifatorial, crônica e degenerativa. As neoplasias malignas decorrem do acúmulo progressivo de alterações genéticas e epigenéticas, fortemente associadas a fatores ambientais, que resultam em crescimento de células anormais, com potencial para invadir partes adjacentes do corpo e/ou espalhar para outros órgãos, gerando um desequilíbrio na homeostase celular.¹

Entre as células neoplásicas e o microambiente ocorrem interações complexas mediadas por processos, tanto autócrinos, quanto parácrinos, que são determinantes para a progressão da doença. Muitos desses processos consistem em vias fisiológicas normais que são alteradas pelas células cancerígenas para conferir-lhes vantagens adaptativas fundamentais para que ocorra a iniciação, a proliferação e a disseminação da doença. Esse processo depende de capacidades específicas adquiridas pelas células tumorais para que haja a progressão do tumor, sendo os meios e a ordem desse processo variáveis entre os diversos tipos de câncer. Essas capacidades incluem: (1) sinais de proliferação autostentados; (2) evasão de sinais supressores de crescimento celular; (3) resistência à morte celular; (4) replicação descontrolada; (5) instabilidade genômica e desenvolvimento de mutações; (6) indução da angiogênese; (7) invasão e metástase; (8) desregulação de vias energéticas; (9) promoção da inflamação e (10) evasão dos mecanismos imunes antitumorais.¹

A carcinogênese ocorre em três estágios. O primeiro denominado “iniciação” é uma fase onde os genes sofrem ações de agentes cancerígenos, ocorrendo de maneira lenta e gradual, mas ainda sem a detecção do tumor.² O segundo estágio é denominado “promoção”, onde os agentes facilitadores da carcinogênese atuam de maneira específica na célula já modificada no primeiro estágio, transformando-a em célula maligna através do contato repetitivo e constante com o agente cancerígeno promotor.² A progressão, que constitui o terceiro estágio da carcinogênese, é marcada pela multiplicação celular descontrolada e por um caráter irreversível, sendo o momento em que se manifestam clinicamente as características do câncer..² Atualmente, entende-se que todos os estágios da carcinogênese e a formação de metástase são consequências das interações complexas estabelecidas entre as células neoplásicas e o microambiente, nas quais os componentes do sistema

imunológico e suas diferentes vias são partes integrantes e diretamente relacionados. Essa compreensão tem sido crucial no diagnóstico e na conduta terapêutica a ser seguida para uma resposta clínica adequada.³

Embora ainda exista a idéia de que o câncer é uma doença relacionada aos tempos modernos, na realidade, ele é conhecido há muitos anos. Há evidências de que o câncer foi encontrado em um hominídeo há cerca de 1,7 milhões anos e que o câncer de próstata foi identificado em uma múmia egípcia.^{4,5}

Estimativa da Organização Mundial da Saúde mostra que, em 2020, 19,2 milhões de pessoas foram acometidas pelo câncer, sendo 10 milhões do sexo masculino e 9,2 milhões do sexo feminino.⁶ Dados da mesma plataforma mostram que a incidência do câncer está distribuída em todo mundo, sendo 49,3% na Ásia, 22,8% na Europa, 13,3% na América do Norte, 7,6% na América Latina e Caribe e 5,7% na África. As neoplasias mais frequentes são mama (11,7%), pulmão (11,4%), colorretal (10%), próstata (7,3%), estômago (5,6%), fígado (4,7%), colo do útero (3,1%) e esôfago (3,1%).⁶

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima-se 704 mil novos casos de câncer por ano no Brasil entre 2023 e 2025, com prevalência diferente entre os sexos. Em homens, a estimativa é de 29% de câncer de pele não melanoma, 21% de próstata, 6,4% de cólon e reto, 5,3% de pulmão, 3,9% de estômago e 3,2% na cavidade oral. Já, em mulheres, o câncer de pele não melanoma representa 32,7%, mama 20,3%, cólon e reto 6,5%, colo de útero 4,7%, pulmão 4,0% e tireoide 3,9%. As regiões com maior incidência no Brasil são a Sul e a Sudeste, com 70% dos casos.⁷

O câncer ocupa um lugar significativo no ranking de morte entre todas as doenças. Dados da Organização Mundial da Saúde mostram que em 2019 o câncer representava a primeira ou segunda causa de morte antes dos 70 anos em mais de 100 países.⁸ Essa liderança está associada ao fato de que em alguns países observa-se um declínio na taxa de mortalidade por doenças coronarianas e acidentes vasculares cerebrais.^{9,10}

1.2 - Câncer de Pulmão

O câncer de pulmão é o tumor maligno mais letal.⁶ Observa-se um aumento de 2% ao ano no mundo.⁶ O câncer de pulmão é dividido em duas categorias, o carcinoma de células pequenas e o carcinoma de células não pequenas. O câncer de

pulmão de células pequenas representa 15 a 20% de todos os cânceres primários de pulmão. Já o câncer de pulmão de células não pequenas representa 80 a 85%. Vale ressaltar que esse tipo de câncer pode ser dividido em outros subtipos, tais como, adenocarcinoma, carcinoma espinocelular pulmonar e carcinoma de células grandes¹¹.

A taxa de sobrevida em pacientes portadores de câncer de pulmão no Brasil é de 18% em 5 anos. Esses valores se assemelham ao do resto do mundo, onde a sobrevida varia de 10 e 20%, independentemente do nível de desenvolvimento do país.¹² A sobrevida em 5 anos é maior em câncer de pulmão de células não pequenas quando comparado ao câncer de pulmão de células pequenas, sendo esses valores 23% e 6%, respectivamente.¹³ Um dos principais problemas associado a uma menor taxa de sobrevivência relacionada ao câncer de pulmão é o diagnóstico tardio. Muitos casos são diagnosticados no estágio muito avançado da doença.¹⁴

Por muito tempo, o câncer de pulmão foi considerado uma enfermidade predominantemente masculina. Esse cenário tem passado por uma transformação notável nas últimas décadas, com um aumento significativo na incidência de câncer de pulmão em mulheres, a ponto de se tornar a principal causa de morte por câncer nessa população nos Estados Unidos. Embora o aumento do consumo de tabaco entre mulheres tenha sido utilizado como explicação para esse cenário, há de se ressaltar que uma parcela considerável de mulheres diagnosticadas com câncer de pulmão jamais foram fumantes.¹⁵

Baseado em dados históricos, observa-se que a mortalidade por câncer aumentou significativamente durante grande parte do século XX, um fenômeno fortemente associado ao tabagismo, especialmente na população masculina. Contudo, uma mudança importante nessa tendência ocorreu a partir de 1991, quando a taxa de mortalidade, atingindo um pico de 215,1 óbitos por 100.000 habitantes, iniciou uma trajetória de declínio constante, com uma redução média anual de aproximadamente 1,5%. Essa diminuição progressiva resultou em uma queda de 27% na taxa de mortalidade até 2016, fixando-se em 156 por 100.000 habitantes. Em termos absolutos, estima-se que essa evolução positiva tenha evitado cerca de 2,6 milhões de mortes.¹⁶

O cigarro contém substâncias cancerígenas as quais são responsáveis por mutações em genes que estão associadas ao câncer.¹⁷ Outros fatores, tais como, a exposição passiva ao fumo, os cigarros eletrônicos comuns em jovens nos dias atuais,

a dieta rica em alimentos processados, a obesidade e a hereditariedade também contribuem para o surgimento do câncer de pulmão.¹⁸ Em uma análise de dados genômicos associados ao câncer de pulmão, pesquisadores investigaram a relação entre o índice de massa corporal, tabagismo e o desenvolvimento de diferentes subtipos da doença. Utilizando a técnica de randomização mendeliana univariada e multivariada, o estudo revelou uma associação entre o índice de massa corporal e o risco de câncer de pulmão de pequenas células. Após o ajuste estatístico para os hábitos de tabagismo, essa associação persistiu para o câncer de pequenas células. Apesar de ter sido observada uma correlação entre o índice de massa corporal e o carcinoma de células escamosas de pulmão tenha sido detetada, essa relação não se manteve após ajuste com o tabagismo. Em conjunto, esses achados chamam atenção para a influência do índice de massa corporal em alguns tipos de câncer de pulmão. Além disso, eles apontam para o papel mediador do tabagismo na complexa interação entre o índice de massa corporal e a patogênese do câncer de pulmão.¹⁹

Estudos mostram que a poluição do ar aumenta a incidência de câncer de pulmão. Um estudo de caso-controle conduzido na China mostrou que o carcinoma espinocelular de pulmão associa-se à inalação profunda da fumaça, à exposição passiva ao tabaco durante a juventude e ao uso de carvão para aquecimento ou cocção em ambientes fechados. Resultados semelhantes foram encontrados em uma coorte de aproximadamente 1,2 milhão de adultos nos Estados Unidos, no qual foram analisadas a relação entre a exposição de longo prazo à poluição do ar particulado fino e o óbito devido ao câncer de pulmão. Esse estudo mostrou associação significativa entre a poluição por partículas finas e o óxido de enxofre e o aumento do risco de mortalidade por todas as causas, câncer de pulmão e doenças cardiovasculares. Especificamente, o estudo indica que um aumento de 10 microgramas por metro cúbico na concentração de partículas finas no ar correlaciona-se com um aumento de aproximadamente 4% no risco de mortalidade por todas as causas, 6% por câncer de pulmão e 8% por causas cardiovasculares.²⁰

Estudos epidemiológicos com uma análise conjunta de dados do *International Lung Cancer Consortium* e do estudo *SYNERGY* mostram uma complexa relação entre o consumo de álcool e o risco de desenvolvimento de câncer de pulmão. Os resultados desses estudos revelam uma associação não linear entre o consumo total de álcool e o risco de câncer de pulmão. Um consumo moderado poderia estar associado a um risco aparentemente menor em comparação com a abstinência.

Entretanto, essa relação em forma de J parece ser mais pronunciada em um subtipo específico da doença, isso é o carcinoma de células escamosas.²¹

Investigações epidemiológicas têm consistentemente demonstrado uma correlação significativa entre a história familiar de câncer de pulmão e o risco aumentado de desenvolvimento da doença. A magnitude desse risco parece se intensificar em indivíduos mais jovens e quando múltiplos membros da família desenvolvem a neoplasia.²²

Avanços significativos em pesquisas genômicas têm contribuído muito para o avanço de conhecimento sobre o desenvolvimento e a progressão do câncer de pulmão. Mutações dos genes EGFR, KRAS, PTEN, DDR2 e HER2 se relacionam a esse tipo de câncer. Além disso, sabe-se que os genes FGFR1 e MET são fortemente expressos em alguns pacientes oncológicos, o que pode inclusive influenciar a resposta terapêutica.²³

O diagnóstico precoce é fundamental para o prognóstico do paciente com câncer de pulmão. Ele aumenta o sucesso do tratamento e a chance de cura do paciente. Diversos fatores e abordagens têm sido utilizados e amplamente discutidos com o objetivo de estabelecer a forma mais eficaz de diagnóstico precoce. Entre elas destacam-se a triagem de grupos de alto risco, como os indivíduos com histórico de tabagismo. O rastreamento e o diagnóstico radiográfico através de exames de imagem têm se mostrado eficazes na detecção precoce e na redução da mortalidade por câncer de pulmão. A imunomarcagem vem se fortalecendo como uma técnica promissora, oferecendo maior sensibilidade e especificidade quando comparada ao tradicional exame de escarro, especialmente na identificação de células cancerígenas em amostras biológicas. A broncoscopia com biópsia do tecido pulmonar continua sendo um dos métodos mais comuns e importantes para obter um diagnóstico definitivo de câncer de pulmão e outras neoplasias torácicas, permitindo a análise histopatológica e molecular do tumor. Além dessas técnicas bem estabelecidas, outras abordagens diagnósticas estão em constante desenvolvimento.²⁴

As células de Lewis, conhecidas como a linhagem celular *Lewis Lung Carcinoma*, são células tumorais murinas amplamente utilizada em pesquisa oncológica como um modelo de câncer de pulmão transplantável em camundongos da linhagem C57BL/6. Esse modelo experimental é extremamente agressivo e apresenta um elevado grau de metástase. Ele é frequentemente utilizado para o estudo de metástase,²⁵ angiogênese²⁶ e avaliações de toxicidade desenvolvida por

quimioterápicos.²⁷ Diferentemente do modelo de xenoenxerto, que dependem da implantação de células humanas em hospedeiros murinos, o modelo de carcinoma pulmonar de *Lewis* apresenta a vantagem de utilizar células imunologicamente compatíveis com o sistema de murino. Essa característica possibilita o estabelecimento de modelos tumorais em linhagens murinas imunocompetentes, como a C57BL, possibilitando assim uma avaliação adequada das interações entre o sistema imunológico e o tumor, bem como as respostas de toxicidade decorrentes de terapias direcionadas. Adicionalmente, o fato do modelo carcinoma pulmonar de *Lewis* ser singênico e ortotópico garante uma representação mais precisa do microambiente tumoral in vivo, um ponto crucial para a compreensão da progressão da doença e da eficácia de potenciais intervenções terapêuticas.²⁸

O modelo de carcinoma pulmonar apresenta algumas características em seu desenvolvimento tumoral após a inoculação subcutânea dorsal. Inicialmente, observa-se a formação de úlceras cutâneas, as quais evoluem para quadros de hemorragia local e um crescimento acelerado.²⁹ Com o intuito de investigar as características de crescimento e a resposta a agentes terapêuticos do carcinoma de pulmão de *Lewis*, pesquisadores desenvolveram uma linhagem celular clonal, denominada LLC1. Mantendo sua capacidade tumorigênica em camundongos da linhagem C57, as células LLC1 induzem o desenvolvimento de tumores primários e metástases pulmonares com características histológicas semelhantes ao tumor original.³⁰

1.3 - Câncer e Doença Cardiovascular

A necessidade de diagnóstico precoce e acompanhamento da doença cardiovascular em pacientes com câncer deu origem a uma nova disciplina da Cardiologia denominada Cardio Oncologia. Essa nova atividade tem proporcionado conhecimentos notáveis sobre o câncer e a doença cardiovascular, conforme ficará evidenciado a seguir.

A presença do câncer e da doença cardiovascular, conhecida como Cardio Oncologia Reversa, tem se tornado cada vez mais frequente.³¹ Contudo, faltam conhecimentos para explicar a coexistência dessas doenças. É possível que pelo fato do câncer e das doenças cardiovasculares terem os mesmos fatores de risco, essas doenças se desenvolvam e progridam simultaneamente. Por exemplo, idade, sexo, obesidade, pré-disposição genética, diabetes, inatividade física, tabagismo,

hipertensão e dislipidemia são fatores de risco de ambos, o câncer e a doença cardiovascular³¹. O próprio estresse emocional e físico em pacientes oncológicos, por si só, pode aumentar o risco de doença cardiovascular.³² Alterações no sistema imunológico que podem ocorrer com a idade diminuem a resposta a patógenos, o que favorece um ambiente pró-inflamatório crônico e o desenvolvimento de câncer e doença cardiovascular³¹. Mutações genéticas estão presentes em ambos, câncer e doença cardiovascular. É amplamente conhecido que uma dieta rica em carne vermelha aumenta o risco de doença cardiovascular e alguns tipos de câncer. Sabe-se também que um baixo nível de atividade física favorece o envelhecimento vascular e o risco de desenvolvimento de câncer e doença cardiovascular. Por outro lado, a prática de exercício físico melhora a saúde vascular e a capacidade física, além de corrigir fatores de risco, tais como, hipertensão, diabetes, dislipidemia e obesidade.³³

Os estudos sobre os mecanismos que norteiam a comunicação cruzada entre o câncer e o coração estão em plena evolução. Alguns fatores, tais como, hormônios, citocinas e outros mediadores que são liberados pelo tumor parecem ter um papel importante neste cenário. O resultado mais dramático dessa comunicação é a associação entre a insuficiência cardíaca e o câncer.³⁴ Um estudo pré-clínico mostrou uma deficiência sistêmica de insulina em modelos murinos portadores de tumores agressivos, tais como, o melanoma e o carcinoma de cólon. A diminuição dos níveis de insulina sistêmica induziu atrofia cardíaca, alterações metabólicas e funcionais cardíacas. Dentro dos mecanismos associados à essa deficiência de insulina estão o elevado consumo de glicose pelas células tumorais, a redução na produção de insulina pancreática e a secreção de enzimas capazes de degradar a insulina.³⁵ Em relação à atrofia cardíaca, essa resposta ocorre por diminuição do tamanho dos cardiomiócitos, acompanhada por uma regulação negativa generalizada das proteínas sarcoméricas.³⁶ O estudo mostrou também uma maior suscetibilidade dos camundongos machos aos efeitos deletérios do tumor, manifestada por perda de massa cardíaca, aumento da mortalidade, resposta inflamatória potencializada e intensificação da autofagia cardíaca, quando comparados às fêmeas, o que pode ser atribuído à presença de estrogênio nesse último grupo.³⁶

Em roedoras fêmeas que receberam o implante de adenocarcinoma de cólon observa-se um aumento de biomarcadores relacionados à degradação proteica, tanto no músculo gastrocnêmio, quanto no músculo cardíaco. Além dessas respostas, as células cancerígenas provocaram disfunção sistólica, o que levou os autores à

conclusão de que o crescimento tumoral, por si só, é capaz de induzir alterações na função contrátil dos cardiomiócitos.³⁷ Em outro estudo com o objetivo de compreender as possíveis alterações na função cardíaca entre os sexos, camundongos machos e fêmeas receberam por via subcutânea células de carcinoma de pulmão de *Lewis*. No 14º dia observou-se através da ecocardiografia uma redução significativa na fração de ejeção, espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo, espessura do septo ventricular e fração de encurtamento nos camundongos machos. Adicionalmente, constatou-se um aumento no diâmetro interno do ventrículo esquerdo, tanto na fase sistólica quanto diastólica do ciclo cardíaco, indicativo de dilatação ventricular. Essas alterações morfológicas e funcionais não foram detectadas no grupo de camundongos fêmeas, o que sugere que o sexo é um fator importante nesse contexto. A análise bioquímica revelou uma redução na taxa de síntese proteica cardíaca. Em relação à bioenergética celular, a avaliação das proteínas mitocondriais do complexo OXPHOS mostrou uma diminuição significativa nos níveis de proteínas estudadas, tais como, os complexos II, III, IV e V. Foi observado também em cardiomiócitos mantidos em cultura, uma redução significativa no consumo máximo de oxigênio e na capacidade de reserva mitocondrial. Com base nesses achados, os autores sugerem alterações específicas na função cardíaca, espessura da parede ventricular, na síntese de proteínas e do consumo de oxigênio mitocondrial relacionadas ao sexo.³⁸

Em um outro estudo conduzido em camundongos com câncer verificou-se que o carcinoma de pulmão de *Lewis* provocou alterações estruturais da inervação cardíaca e um estado pró-inflamatório sistêmico, caracterizado pela elevação dos níveis séricos de TNF- α e Il-6. A análise morfológica do ventrículo esquerdo mostrou uma redução significativa no comprimento total dos axônios e no número de vesículas densas por perfil axonal, indicando diminuição na inervação simpática no coração. Os cardiomiócitos apresentaram também sinais de alterações metabólicas, como, diminuição do volume miofibrilar e aumento do volume sarcoplasmático e de gotículas lipídicas. No âmbito molecular, observou-se uma redução na expressão do fator de crescimento nervoso no tecido cardíaco. Curiosamente, o gânglio estrelado desses animais exibiu uma diminuição nos níveis de mRNA do fator de crescimento nervoso e neuropeptídeo Y, juntamente com um aumento na expressão da tirosina hidroxilase. Em conclusão, os autores sugerem que o câncer de pulmão induz um ambiente inflamatório sistêmico que influencia diretamente a inervação do coração e o metabolismo dos cardiomiócitos, sendo a redução do fator de crescimento nervoso

um possível mecanismo subjacente à diminuição da inervação cardíaca.³⁹

Em modelos murinos machos, inoculados com adenocarcinoma de cólon-26, observou-se caquexia com repercussão na função cardíaca. Houve um aumento na fibrose cardíaca e uma desorganização na ultraestrutura dos cardiomiócitos. Análises adicionais revelaram diminuição de troponina I e transição nas isoformas da cadeia pesada da miosina, com redução na isoforma adulta (alfa) e aumento na fetal (beta). Diante dessas respostas, os autores concluíram que a caquexia associada ao câncer contribui não somente para a morbidade e mortalidade através da perda de massa muscular, mas também, para a deterioração da função cardíaca.⁴⁰

Em um estudo recente publicado pelo nosso grupo, com o objetivo de avaliar o impacto do câncer de mama na função cardíaca, verificou-se diminuição significativa no *strain* longitudinal e no *strain rate* longitudinal nos animais com câncer.⁴¹ Ademais, essas alterações estão associadas ao aumento na expressão de fosfolamban e redução na expressão do trocador sódio/cálcio e modificações na razão SERCA2a/fosfolamban e p-fosfolamban⁴¹.

Em estudo clínico observou-se que pacientes com câncer de colorretal têm uma capacidade física significativamente diminuída quando comparados com indivíduos saudáveis. Adicionalmente, observou-se uma redução, tanto na fração de ejeção, quanto na variabilidade da frequência cardíaca. Esses resultados levaram os autores à conclusão de que pacientes com câncer de colorretal, independentemente da exposição à quimioterapia, apresentam alterações cardiovasculares e na capacidade física.⁴²

Com o objetivo de investigar se alterações estruturais e funcionais no coração, mesmo na ausência de insuficiência cardíaca manifesta, poderiam influenciar o desenvolvimento e a disseminação do câncer, pesquisadores desenvolveram um elegante estudo utilizando um modelo experimental de hipertrofia cardíaca induzida por sobrecarga pressórica em camundongos, seguido pela implantação por via cutânea de células cancerígenas da linhagem LLC e células cancerígenas PyMT.⁴³ Eles observaram que a remodelação cardíaca provoca um crescimento tumoral primário mais acentuado, acompanhado por uma maior taxa de proliferação celular e um aumento no número de lesões metastáticas. Além disso, a análise do soro dos animais com remodelamento cardíaco revelou a presença de fatores secretados capazes de estimular a proliferação de células cancerígenas in vitro, sendo a periostina (proteína importante na manutenção de uma matriz tecidual normal dos

pulmões) um desses mediadores. A redução da disponibilidade dessa proteína resultou em inibição da proliferação celular cancerígena, enquanto a sua suplementação provocou um efeito contrário.

Em um estudo de caso-controle, que envolveu a análise comparativa da história de câncer entre um grupo de pacientes diagnosticados com insuficiência cardíaca e um grupo de controle comunitário, pareado por idade e sexo, mostrou que a prevalência de câncer era semelhante entre eles, representando 22 e 23%, respectivamente. No entanto, o acompanhamento longitudinal dos participantes que não apresentavam câncer no momento do diagnóstico de insuficiência cardíaca tiveram um risco de 68% maior de desenvolvimento de câncer, mesmo após o ajuste para fatores de risco como índice de massa corporal, tabagismo e outras comorbidades. Esse aumento no risco de câncer foi observado tanto em homens, quanto em mulheres, com uma tendência a ser mais elevada em indivíduos mais jovens. Além disso, a ocorrência de câncer após o diagnóstico de insuficiência cardíaca foi associada a um aumento no risco de mortalidade entre os pacientes com insuficiência cardíaca.⁴⁴

Em um estudo envolvendo 9.307 pacientes na Dinamarca, com o objetivo de avaliar o risco de câncer e mortalidade por todas as causas em pacientes ambulatoriais diagnosticados com insuficiência cardíaca crônica, mostrou uma maior incidência de câncer no grupo com insuficiência cardíaca em comparação com a população. Esse estudo evidenciou também que os pacientes com insuficiência cardíaca apresentaram uma taxa de mortalidade por todas as causas superior àquela observada em indivíduos da população controle. A análise estatística ajustada para potenciais fatores de confusão apontou para o fato de que a insuficiência cardíaca crônica pode estar associada a um risco aumentado em todos os principais tipos de câncer, tais como, fígado, pulmão, mama, rins, entre outros. com exceção do câncer de próstata. Baseados nesses resultados, os autores concluíram que os pacientes com insuficiência cardíaca têm um risco aumentado de desenvolvimento de câncer.⁴⁵

Na tentativa de melhor entender a ligação entre a disfunção cardíaca e o desenvolvimento de neoplasias, alguns investigadores observaram um aumento expressivo na carga tumoral, mesmo quando o comprometimento hemodinâmico foi minimizado por transplante cardíaco heterotópico.⁴⁶ Nesse estudo ficou caracterizada uma correlação significativa entre a gravidade da disfunção ventricular e da fibrose miocárdica com o crescimento tumoral, o que sugere que a liberação de fatores

cardíacos decorrentes da disfunção cardíaca favorece a progressão neoplásica. De fato, há evidências de que a serpina3 que tem um papel fundamental na manutenção da homeostase celular pode, paradoxalmente, provocar proliferação de células cancerígenas.⁴⁶

1.4 - Alterações Cardiovasculares Provocadas pelo Tratamento do Câncer

É inegável a evolução no tratamento do câncer nas últimas décadas. Contudo, evidências mostram que o tratamento antineoplásico pode desencadear alterações significativas no sistema cardiovascular. O uso de quimioterapias convencionais (antraciclinas), agentes direcionados (inibidores de HER2), imunoterapias (inibidores de *check point* imunológicos) e radioterapia, podem provocar arritmias, cardiomiopatias, doença vascular arterial, tromboembolismo venoso, hipertensão arterial e venosa, doença pericárdica e doença valvar cardíaca.⁴⁷

Em pacientes com câncer de mama, o tratamento com doxorrubicina e trastuzumab pode provocar um declínio significativo na fração de ejeção do ventrículo esquerdo.⁴⁸ Há também observações de que o tratamento com doxorrubicina pode provocar alterações neurovasculares e diminuição da capacidade física que são comparáveis às de pacientes com insuficiência cardíaca de outras etiologias em estágio avançado. Num estudo recente, o nosso grupo verificou que o aumento na atividade nervosa simpática, avaliada diretamente no nervo fibular em pacientes com insuficiência cardíaca, causada pelo tratamento de doxorrubicina, é semelhante àquele em pacientes com insuficiência cardíaca de outras etiologias.⁴⁹ Ademais, a intolerância ao exercício é também semelhante entre esses dois subgrupos de pacientes com insuficiência cardíaca.

A doxorrubicina altera as proteínas do miocárdio, resultando em modificações no ritmo cardíaco e na taxa de consumo de oxigênio do miocárdio. O estresse oxidativo causado por esse fármaco antibiótico, antineoplásico e citotóxico pode provocar alterações nas proteínas relacionadas às vias de cálcio, tais como, a SERCA, a fosfolamban e o receptor de rianodina, cujo resultado é a diminuição da fração de ejeção e a dilatação do ventrículo esquerdo.⁵⁰ Outros estudos mostraram que pacientes com câncer de mama, leucemia ou linfoma submetidos à quimioterapia à base de antraciclinas, independentemente do sexo, idade, raça ou fatores de risco cardiovascular, podem apresentar diminuição no desempenho cardíaco sistólico e

rigidez aórtica no primeiro ano de tratamento, mesmo quando os pacientes são expostos a doses baixas do tratamento quimioterápico.⁵¹ Um estudo recente, conduzido em modelo animal, mostrou que a doxorrubicina provoca disfunção do ventrículo esquerdo associada à modulação de cálcio e que essas alterações são potencializadas pela administração de trastuzumabe.⁵² Em nossa experiência, mulheres submetidas à quimioterapia adjuvante aguda com doxorrubicina e ciclofosfamida apresentam alteração significativa nas respostas neurovasculares e hemodinâmicas logo após a infusão desses quimioterápicos. Nesse estudo ficou evidenciado também um aumento na atividade nervosa simpática e na pressão arterial, acompanhado por uma redução no fluxo sanguíneo e na condutância vascular periférica. Além dessas respostas, observou-se um aumento nas micropartículas endoteliais circulantes, um marcador de dano vascular em nível molecular. Essas respostas durante uma única sessão de quimioterapia levantam a importância do cuidado do paciente oncológico tratado com antraciclina.⁵³

Em um estudo prospectivo de fase III que acompanhou pacientes com câncer de mama em estágio inicial ao longo de cinco anos mostrou que diferentes regimes de quimioterapia adjuvante à base de antraciclina podem causar características distintas de cardiotoxicidade. Foi observado que os esquemas epirrubina e ciclofosfamida seguidos por paclitaxel e doxorrubicina e ciclofosfamida seguidos por paclitaxel semanal, têm um risco significativamente menor de eventos cardíacos em comparação com o regime padrão de ciclofosfamida, epirrubina e fluoruracila.⁵⁴

Uma análise do tecido cardíaco humano de pacientes com insuficiência cardíaca relacionada à doxorrubicina mostrou um aumento na proteína TFEB nuclear (regulador de autofagia). Um regime em dias alternados em camundongos tratados com doxorrubicina não apenas elevou a mortalidade, mas também diminuiu a função cardíaca, isto é, um efeito semelhante ao observado com a superexpressão de TFEB. Um aprofundamento na via TFEB mostrou que a superexpressão dessa proteína em cardiomiócitos desencadeia remodelamento cardíaco adverso, enquanto a superexpressão sistêmica resulta em aumento do fator de diferenciação de crescimento⁵⁵ que, por sua vez, leva à insuficiência cardíaca e óbito. Por outro lado, a inativação gênica de TFEB em cardiomiócitos atenua os efeitos cardiotóxicos da doxorrubicina, enquanto a administração de GDF15 recombinante induz atrofia cardíaca. Em conjunto, esses resultados apontam para uma complexa interação entre a ativação da via TFEB/GDF15 e a cardiotoxicidade provocada por doxorrubicina⁵⁵.

Um estudo clínico no qual se investigou a saúde cardíaca em sobreviventes de linfoma de Hodgkin e não-Hodgkin, tratados com doxorubicina há no mínimo cinco anos, mostrou uma redução na fração de encurtamento do ventrículo esquerdo compatível com o desenvolvimento de cardiomiopatia subclínica. A análise multivariada identificou diversos fatores de risco, tais como, sexo masculino, idade no momento do tratamento, maior dose cumulativa de doxorubicina ou sua combinação com outras antraciclinas, administração de radioterapia e sobrepeso. Esses resultados chamam atenção para a importância do monitoramento cardíaco em sobreviventes de linfoma tratados com doxorubicina, sobretudo, naqueles com fatores de risco.⁵⁶

Num estudo retrospectivo em mulheres submetidas a tratamento cirúrgico para o câncer de mama que não receberam tratamento adjuvante e aquelas que foram submetidas à radioterapia isolada, quimioterapia à base de antraciclina isolada ou combinação de ambas as terapias, mostrou que as três modalidades de tratamento adjuvante associam-se a um aumento significativo no risco de eventos cardíacos, com a terapia combinada apresentando o risco mais elevado. Verificou-se também que o risco cardíaco é ainda maior em pacientes com mais de 50 anos. Esse estudo evidencia a importância do efeito cardiotoxico da radioterapia e quimioterapia associadas, especialmente em pacientes mais idosas.⁵⁷

Em um estudo onde os autores analisaram retrospectivamente dados de ensaios clínicos de fase II e III para estimar o risco de disfunção cardíaca em pacientes recebendo trastuzumabe mostrou que os pacientes tratados com trastuzumabe apresentam um risco aumentado de disfunção cardíaca, sendo a incidência mais elevada (27%) em pacientes que receberam trastuzumabe associada com antraciclina e ciclofosfamida. Em contraste, o risco foi menor com paclitaxel e trastuzumabe (13%) ou trastuzumabe isolado (3% a 7%). Esses resultados levaram os autores a concluir que o tratamento com trastuzumabe está associado a um risco aumentado de disfunção cardíaca, especialmente quando administrado concomitantemente com antraciclinas.⁵⁸ Outro estudo recente sobre esse tema mostrou que pacientes com câncer de mama que receberam trastuzumabe, com ou sem antraciclinas, apresentavam disfunção sistólica ventricular esquerda assintomática, biomarcadores cardíacos alterados (como peptídeo natriurético tipo B N-terminal e troponina T cardíaca de alta sensibilidade) e fatores de risco cardiovascular (hipertensão, dislipidemia e diabetes recém-diagnosticado).⁵⁹

Há evidências também de que os inibidores de tirosina quinase podem causar cardiotoxicidade. Disfunção ventricular, prolongamento do intervalo QT, arritmias e insuficiência cardíaca têm sido descritos com o uso desses inibidores.⁶⁰ É conhecido também que a incidência de isquemia miocárdica, arritmias, disfunção ventricular e insuficiência cardíaca varia de acordo com a dose, regime de administração de 5-fluorouracila e capecitabina.⁶¹ Sabe-se também que o tratamento com fluoropirimidina aumenta o risco de morte e eventos cardiovasculares em pacientes com câncer gastrointestinal.⁶² Cardiotoxicidade também tem sido associada ao uso de inibidores de proteassoma, uma classe de medicamentos fundamentais no tratamento de diversas neoplasias hematológicas.⁶³

Finalmente, é conhecido que os inibidores de *checkpoint* imunológico, que tem como objetivo potencializar as respostas imunológicas mediadas por células T, podem provocar miocardites, arritmias ventriculares, infarto agudo do miocárdio, síndrome de Takotsubo e pericardite.⁶⁴ Uma meta-análise mostra que os inibidores de *checkpoint* imunológico podem induzir eventos adversos cardiovasculares significativos, tais como, miocardite, pericardite e insuficiência cardíaca. O estudo enfatiza a importância de um monitoramento cardíaco rigoroso em pacientes recebendo inibidores de *checkpoint* imunológico para o manejo dessas complicações, visando otimizar a segurança do paciente sem comprometer a eficácia do tratamento oncológico.⁶⁵

Alguns cuidados têm sido propostos para atenuar os efeitos cardiotoxícos provocados pelas terapias antineoplásicas. Por exemplo, um estudo randomizado, duplo cego mostrou que tratamento com carvedilol preservou a função ventricular.⁶⁶ Além disso, o tratamento com carvedilol preveniu o aumento troponina I. Esses resultados sugerem que a administração profilática de carvedilol pode representar uma abordagem promissora na atenuação da cardiotoxicidade induzida por antraciclinas, mesmo em doses consideradas baixas.⁶⁶

2. JUSTIFICATIVA

Observações acumuladas nas últimas décadas evidenciam cada vez mais o desenvolvimento da doença cardiovascular no paciente oncológico. Está claro que alguns medicamentos usados no tratamento do câncer aumentam o risco de doença cardiovascular. Mais recentemente, surgiu uma nova área de estudo conhecida como Cardio Oncologia Reversa que se ocupa em explicar como as doenças

cardiovasculares podem influenciar o desenvolvimento e a progressão do câncer. Esse ponto tem sido objeto de muito interesse e investigações. No presente estudo, hipotetizamos que o câncer per si provocar alteração cardiovascular.

Por terem os mesmos fatores de risco e surgirem em fases mais avançadas de vida, parece legítimo propor que o câncer e a doença cardiovascular se desenvolvam simultaneamente ou que o aparecimento de uma delas acabe favorecendo a progressão e o desenvolvimento da outra.

Dados epidemiológicos mostram que o câncer de pulmão é um dos tipos de câncer de maior incidência e prevalência. Além disso, sabe-se que esse tipo de câncer é responsável por uma elevada taxa de mortalidade. O que ainda é pouco conhecido é se o câncer de pulmão, por si só, pode provocar alterações no sistema cardiovascular. Aqui reside o desafio do presente estudo. Com o intuito de ampliar conhecimento sobre a associação do câncer de pulmão e da doença cardiovascular, nós estudamos se camundongos da linhagem C57BL/6 transplantados com células de *Lewis Lung Carcinoma* desenvolvem alterações na função cardíaca e se tais alterações estão relacionadas à modulação de cálcio no cardiomiócito.

3. OBJETIVOS

Nós testamos a hipótese de que:

- 1) O câncer de pulmão provoca alteração na morfologia e função cardíaca
- 2) O câncer de pulmão provoca alteração modulação de cálcio no cardiomiócito;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Modelo experimental e cultura de células

Para desenvolver este trabalho, foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6, com idades entre 6 e 8 semanas, provenientes do biotério central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Os animais permaneceram nas instalações do biotério, onde foram mantidos em caixas de polipropileno (medidas padrão de (30 x 20 x 13 cm) com telas gradeadas e forradas com maravalha devidamente esterilizada. Cada gaiola continha um máximo de três camundongos. O ambiente era controlado, com temperatura mantida entre 22°C - 24°C, recebendo ração e água *ad libitum*.

Todos os procedimentos experimentais estão em total conformidade com a Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e com as demais regulamentações vigentes para o uso de animais em pesquisa e/ou ensino, em particular as Resoluções Normativas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. As diretrizes éticas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/FMUSP) foram integralmente seguidas. O monitoramento de dor e desconforto nos animais incluiu a aplicação de um sistema padronizado de codificação comportamental conhecido como escala *Mouse Grimace Scale*.⁶⁷ Foram observados indicadores de alteração no comportamento típico da espécie, tais como postura arqueada, vocalização durante o manejo, piloereção e perda de peso acentuada. Para atenuar sofrimentos intensos, estava previsto no protocolo a eutanásia imediata de qualquer animal em estado de dor severa, mesmo que o volume tumoral não tivesse atingido o limite de 1 cm³. Este estudo foi aprovado e registrado sob o protocolo número 1636/2021 pelo comitê de ética no uso de animais da FMUSP.

Utilizamos a linhagem celular murina de carcinoma pulmonar (LLC1 – CRL-1642) que foi adquirida junto à *American Type Cell Collection* (ATCC). O cultivo dessas células foi realizado em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagles Medium, Life Technologies*). Este meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (Life Technologies). As células foram mantidas em frascos de cultura de poliestireno, dentro de uma incubadora com temperatura de 37°C, e umidade relativa de 90%.

4.2 Protocolo experimental

Camundongos machos C57BL/6, com idades entre 6 e 8 semanas, foram aleatoriamente divididos em dois grupos: 1) Grupo controle saudável (n=28); 2) Grupo câncer (n=28), no qual os camundongos receberam o implante de células tumorais LLC1 (8×10^5 células) no flanco direito.

Na fase inicial do protocolo experimental, foram realizados o teste de esforço progressivo máximo em esteira rolante e a avaliação da função cardíaca por meio de ecocardiografia de alta resolução. O crescimento tumoral foi monitorado a cada dois dias, utilizando um paquímetro digital. O estudo foi finalizado quando o tumor atingiu a dimensão de 1,0 cm³, em conformidade com as recomendações éticas do CEUA. Nesse ponto, o teste de esforço máximo e a avaliação da função cardíaca foram

novamente realizados em todos os animais. Posteriormente, a eutanásia foi efetuada, e o material biológico foi coletado para as demais avaliações, conforme previamente demonstrado na Figura 1.

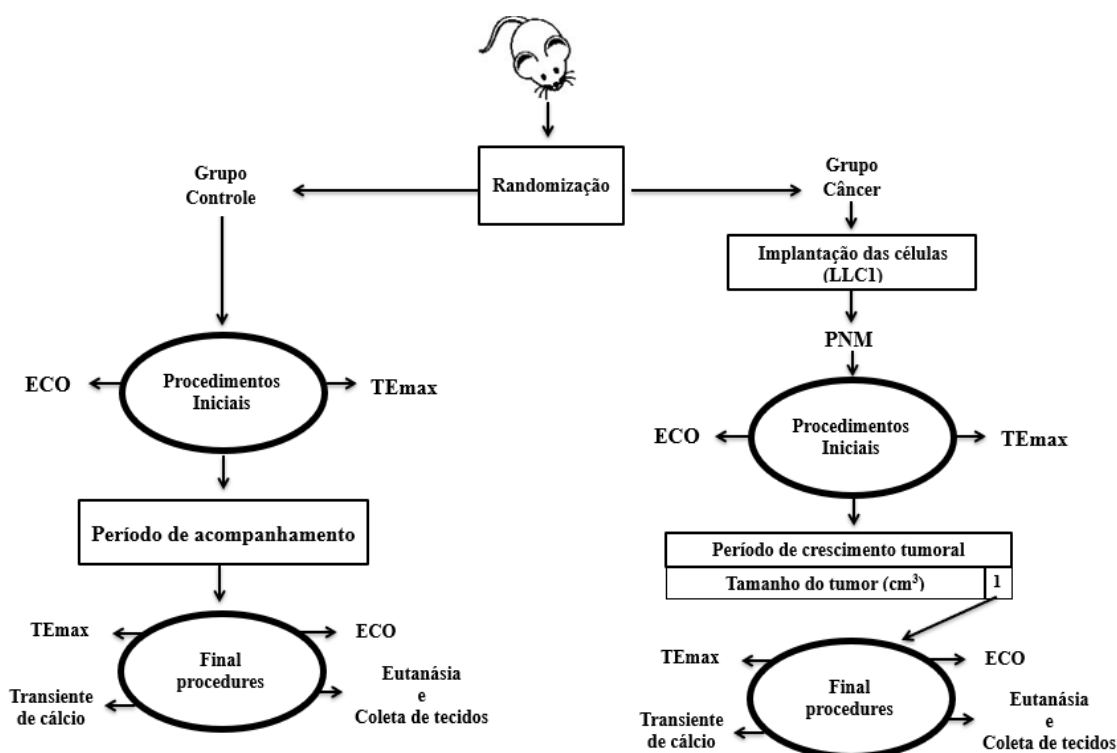


Figura 1. Desenho experimental. TEmax = Teste de esforço máximo; ECO = avaliação ecocardiográfica; PNM = Palpável não mensurável.

4.3 Procedimentos e Medidas

4.3.1 Mensuração do Crescimento Tumoral por Paquímetro Digital

O crescimento tumoral das células de Lewis foi controlado por palpação e por subsequente aferição do tamanho tumoral. Para tanto, utilizou-se um paquímetro digital, com medição a cada dois dias. Presumindo-se que o tumor apresentava uma forma denominada hemi-elipsoidal, o volume tumoral era estimado através da fórmula:

Volume em centímetros cúbicos = (diâmetro menor elevado ao quadrado × Diâmetro maior × 0,52).^{68,69}

4.3.2 Capacidade física avaliada pelo teste em esteira

Para avaliar a capacidade física dos camundongos, utilizou-se um teste incremental em esteira rolante. Inicialmente, conduziu-se uma adaptação prévia de dois dias antes da data programada para o teste de esforço.

Para a realização do teste incremental de corrida na esteira rolante, o camundongo era posicionado numa raia, com uma velocidade inicial estabelecida em 6 metros por minuto. A cada 3 minutos, a velocidade era incrementada em 3 metros por minuto, até o ponto em que o animal atingisse sua velocidade máxima suportada.⁴¹ Essa velocidade limite foi determinada pela incapacidade do animal de manter a corrida na esteira.

Imediatamente após a evidente manifestação de exaustão, três parâmetros foram registrados para a análise subsequente: a distância total (em metros) percorrida, a velocidade máxima (em metros por minuto) atingida pelo animal e, por fim, a duração total (em minutos) da execução do teste. Esses dados foram anotados para a avaliação da performance física.

4.3.3 Avaliação da Função e Morfologia Cardíaca por Ecocardiografia

A avaliação da morfologia e da função cardíaca foi conduzida utilizando o ecocardiograma transtorácico de alta resolução. O protocolo de imagem do sistema Vevo 2100 (VisualSonics, Toronto, ON) foi utilizado em conjunto com uma sonda MS400, que opera com uma frequência de linha central de 30 MHz..

Para a realização do exame, os camundongos receberam sedação com isoflurano (Zoetis IsoFlo, Kalamazoo, MI), com uma concentração de 3,0% durante todo o procedimento. Os animais foram posicionados em **decúbito dorsal** sobre uma mesa termicamente controlada, onde a temperatura corporal central foi mantida a 37 °C, com monitoramento eletrocardiográfico incorporado.

A obtenção das imagens foi realizada inicialmente no modo bidimensional nas vistas paraesternal (eixo longo e eixo curto) e, subsequentemente, na vista apical de 4 câmeras. O modo M, guiado pelo modo 2D, foi utilizado para obter as seguintes medidas do ventrículo esquerdo: diâmetro diastólico final, diâmetro sistólico final, espessura do septo interventricular e espessura da parede posterior. Com base nessas medições do modo M, foram calculadas a fração de ejeção e a fração de encurtamento através do método de Teichholz.

O exame da função diastólica foi complementado através do ecocardiograma padrão, que utilizou as técnicas de Doppler por onda pulsada e Doppler tecidual. As velocidades do fluxo transmitral foram capturadas em uma visão apical de eixo longo, com o volume de amostra posicionado nas extremidades dos folhetos mitrais. O Doppler de ondas pulsadas permitiu mensurar as velocidades de pico do influxo transmitral diastólico (ondas E e A), definindo a relação E/A. Tanto o tempo de relaxamento isovolumétrico quanto o tempo de desaceleração da onda E foram ajustados pela frequência cardíaca. Para a determinação do índice de performance do miocárdio, foram medidos os tempos de ejeção e de contração isovolumétrica. Finalmente, a velocidade diastólica precoce do anel mitral (E') foi obtida por Doppler tecidual, permitindo o cálculo da relação E/E'. Este protocolo de ecocardiografia segue a metodologia padrão estabelecida em nosso grupo de pesquisa.⁴¹

4.3.4 Avaliação da Morfologia e Função Cardíaca Através da Análise de *Speckle-Tracking*

A captura das imagens para análise de *speckle-tracking* iniciou-se nas vistas paraesternal, tanto no eixo longo quanto no eixo curto, com foco especial na região do nível papilar. Previamente à gravação, as configurações relativas à profundidade, largura e ganho foram ajustadas de forma otimizada para maximizar a qualidade visual. Para viabilizar o rastreamento de manchas, foram utilizados planos bidimensionais que garantiam uma taxa de quadros de 200 quadros por segundo ou superior.

As imagens foram todas armazenado digitalmente em sequências compostas por 300 quadros por ciclo cardíaco. A análise dos dados obtidos foi realizada integralmente por meio do software Vevo Strain (Vevo LAB 1.7.1). O *strain* (deformação miocárdica) foi calculado em três orientações distintas: no eixo radial (tanto curto quanto longo), que quantifica o espessamento da parede do ventrículo esquerdo ao longo do raio; no eixo longitudinal, que mede o encurtamento do ventrículo esquerdo em seu eixo maior; e no eixo circunferencial, que avalia a redução na circunferência da cavidade ventricular esquerda. Adicionalmente, foi determinado o strain rate, que se destina a quantificar a taxa de alteração da deformação ao longo do tempo. Este protocolo de ecocardiografia segue a metodologia padrão estabelecida

em nosso grupo de pesquisa.⁴¹

4.3.5 Isolamento de cardiomiócitos de camundongos adultos

Camundongos com câncer foram eutanasiados quando o tumor atingiu um volume de 1 cm³. Ao mesmo tempo, camundongos sem câncer também foram eutanasiados. Ambos os grupos foram eutanasiados pela administração de uma dose inalatória letal do anestésico isoflurano. Os corações dos camundongos foram isolados e imediatamente perfundidos ex vivo usando um sistema de Langendorff, seguindo um protocolo adaptado.⁷⁰

O sistema foi inicialmente limpo com etanol 70% e água destilada antes de ser equilibrado com um tampão de digestão gelado (130 mM de NaCl, 1 mM de ácido L(+)-lático, 5,4 mM de KCl, 3 mM de ácido pirúvico, 25 mM de HEPES, 0,5 mM de MgCl₂, 0,33 mM de NaH₂PO₄, 22 mM de glicose e 50 µU/ml de insulina bovina, pH = 7,39) a um fluxo de aproximadamente 3 mL/min.

O coração foi suspenso pela aorta e a perfusão foi iniciada imediatamente com o tampão de digestão, 0,048 mM de CaCl₂ e 12 mg de Colagenase tipo II (solução 1). O fluxo foi reduzido para 1,5 mL/min quando a Solução 1 atingiu o coração, e a perfusão continuou por cerca de 15 minutos até que o coração parecesse mole. O coração foi então transferido para uma placa de dissecação com a Solução 1, os átrios e vasos foram removidos e os ventrículos foram cuidadosamente picados. O tecido foi cuidadosamente disperso por pipetagem em um banho a 37 °C com a Solução 2 (contendo 0,096 mM de CaCl₂, 8 mg de Colagenase e 100 mg de BSA) por 2 minutos.

A suspensão de células foi filtrada através de uma malha e centrifugada a 500 rpm por 1 minuto em temperatura ambiente. O pellet resultante foi exposto sequencial e gradualmente a concentrações crescentes de cálcio por meio de ressuspensão na Solução 3 aquecida (200 mg de BSA e 0,25 mM de CaCl₂) e, em seguida, na Solução 4 (200 mg de BSA e 0,5 mM de CaCl₂), com períodos de descanso de 1 minuto e centrifugação a 500 rpm após cada etapa. Finalmente, as células foram ressuspensas na Solução 5 com a concentração final de cálcio (1,2 mM de CaCl₂) para uso em experimentos.

4.3.6 Encurtamento e realongamento de cardiomiócitos

As propriedades de contração dos cardiomiócitos foram avaliadas usando um sistema baseado em vídeo (SarcLen, IonOptix) projetado para a aquisição do espaçamento dos sarcômeros. Os experimentos foram conduzidos a 37 °C em uma solução de banho contendo concentrações fisiológicas de cálcio (1,2 mM de CaCl_2). As alterações no comprimento dos sarcômeros foram registradas continuamente em alta taxa de aquisição e processadas usando o software IonWizard (IonOptix). O encurtamento do sarcômero foi quantificado em condições de estimulação basal e estável.⁷¹

4.3.7 Transiente de cálcio

A análise dos transientes de Ca^{2+} intracelular foi conduzida utilizando o indicador fluorescente Fura-2/AM (Molecular Probes, EUA), um composto permeável à membrana plasmática. Inicialmente, os cardiomiócitos foram submetidos à incubação com uma solução de Fura-2/AM, ajustada para uma concentração final de 2 $\mu\text{mol/ml}$, por um período de 20 minutos à temperatura ambiente.

Na fase seguinte, a solução de cultura contendo o indicador foi trocada por um meio novo, isento de Ca^{2+} fluorescente. Tal etapa foi necessária para assegurar a clivagem do AM-éster, processo que demandou um tempo adicional de 20 minutos.

Concluída esta preparação, o transiente de Ca^{2+} foi restabelecido pela aplicação de estímulos elétricos aos cardiomiócitos. Para a estimulação, utilizou-se um Myopacer (Field Stimulator, Lonoptix, EUA), que forneceu pulsos em frequências de 0,5 e 3,0 Hz, mantendo a intensidade fixa em 20 volts e a duração do estímulo em 5 segundos, tudo sob temperatura ambiente controlada.

A medição dos transientes foi efetuada em um microscópio invertido (Nikon TE-2000E, Japão), acoplado a um sistema fotométrico que possibilitou a leitura da fluorescência no comprimento de onda de emissão de 510 nm. O indicador foi, então, submetido à excitação de forma alternada nos comprimentos de onda de 340 e 380 ($F_{340/380}$), por meio do sistema Optoscan (Cairn Research, Reino Unido). Gostaríamos de registrar que esta análise contou com o apoio e a colaboração do Laboratório de Integração dos Sistemas Biológicos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

4.3.8 Eutanásia e coleta do material biológico

A eutanásia ocorreu no término do protocolo experimental, por meio da administração de uma dose inalatória letal do anestésico isoflurano. Esse procedimento foi rigorosamente conduzido em estrita conformidade com os princípios éticos e as recomendações estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA), garantindo o bem-estar animal e a integridade da pesquisa.

Após a eutanásia, os órgãos de interesse foram coletados. Dentre eles o coração, fígado, pulmão, baço e rins. Cada órgão foi devidamente pesado e armazenado sob condições controladas, em preparação para as análises subsequentes.

4.3.9 Análises histológicas

A preparação das amostras cardíacas começou com a fixação em solução de formalina tamponada a 10%, mantida por um período total de 48 horas. Finalizada a etapa de fixação, os tecidos foram encaminhados para o Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto do Coração (HCFMUSP), onde se encontra o serviço especializado em confecção de lâminas.

O processamento histológico envolveu a desidratação e o subsequente embebição em parafina. O tecido, uma vez parafinado, foi cortado em seções de 5 micrômetros de espessura.

As lâminas resultantes foram submetidas a duas colorações: Hematoxilina-Eosina destinada à avaliação do diâmetro dos cardiomiócitos e Picrosirius Red para quantificar a área da fração de colágeno, indicativa de fibrose.

Para as análises morfométricas, a mensuração do diâmetro transversal dos cardiomiócitos foi executada utilizando-se um sistema computadorizado (LEICA QUANTIMET 500, Alemanha). Este equipamento estava conectado a um microscópio óptico configurado com um aumento de 40x. Para garantir a robustez e segurança dos dados, os diâmetros dos cardiomiócitos foram calculados a partir da média de medições obtidas em 10 campos microscópicos distintos por animal.

4.3.10 Extração proteica e análise de *Western Blot*

A técnica de Western Blot foi empregada para quantificar a expressão proteica no tecido miocárdico, incluindo o trocador sódio/cálcio (NCX), a Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (SERCA2), o fosfolamban (PLN) e o fosfolamban fosforilado (p-PLN).

Para a extração das proteínas totais do miocárdio, iniciamos com a preparação de um lisado celular. Este lisado foi obtido utilizando o tampão de lise RIPA cuja composição inclui 50 mM de Tris-HCl pH 7,4, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1% de NP40, 0,25% de Na-desoxicolato, o qual foi complementado cuidadosamente com inibidores de proteases (Sigma-Aldrich) para preservar a integridade das proteínas. A solução resultante foi mantida sob agitação intermitente em *vortex* (a cada 5 minutos) por um total de 15 minutos no gelo, visando a lise completa. Após a lise, o material foi então centrifugado a 13.000 rpm por 20 minutos, sob refrigeração (4°C), separando as proteínas do material celular remanescente.

A concentração total de proteína foi determinada através do ensaio de Bradford (*Coomassie Plus, The Better Bradford Assay™ Kit, Pierce, Rockford, IL*), foi construída uma curva padrão utilizando diluições seriadas de albumina sérica bovina, com concentrações de 0 a 2 mg/mL. Tanto as diluições de albumina sérica bovina quanto as amostras de extrato proteico, as quais foram previamente diluídas 10 vezes, foram submetidas à análise em duplicata, em uma placa de 96 poços.

Adicionou-se 295 μL do reagente de Bradford a 5 μL de cada amostra/diluição. A placa foi então incubada por um tempo de 10 minutos à temperatura ambiente, protegida da luz, para permitir a reação colorimétrica. A absorbância foi lida no comprimento de onda de 595 nm no leitor Biotrak II Plate Reader (GE Healthcare). Finalmente, a concentração de proteína em cada extrato foi determinada através da equação da reta obtida a partir da curva padrão de absorbância.

Para o preparo da eletroforese, alíquotas de 30 μg de proteína foram desnaturadas a 95°C durante 5 minutos na presença do tampão de desnaturação Laemmli 4x (7,5% Tris 2M pH 6,8, 0,5% SDS, 5% azul de bromofenol, 26% de glicerol e 16,5% de 2-mercaptoetanol), ajustado para uma concentração final de 1x. A separação das proteínas, com base em seu peso molecular, foi então realizada por eletroforese em gel de SDS-PAGE a 12%. O tampão de corrida utilizado foi o Tris-Glicina (250 mM Tris, 1,92 M Glicina, 1% SDS). A corrida eletroforética foi iniciada com a aplicação de 70 V por 20 minutos, seguida por uma voltagem de 100V por

aproximadamente 2 horas, separando as bandas proteicas com base no peso molecular. Após a separação das bandas proteicas, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Pierce). Esse procedimento de transferência durou por 50 minutos à voltagem de 15V, sendo executado no Trans-Blot SD Semi-dry Transfer Cell (*Bio-Rad, Hercules, CA*). O tampão de transferência era composto por 48mM Tris, 39mM Glicina, 0,0375% SDS e 20% de metanol. Posteriormente, as membranas foram submetidas ao bloqueio inespecífico com uma solução de 5% de albumina sérica bovina em TBS-T (2,42g/L Tris-Base, 8g/L NaCl, 0,1% Tween20) por um período de 16 horas em 4°C. A etapa seguinte foi a incubação das membranas com os anticorpos primários específicos, procedimento que foi conduzido à temperatura ambiente, por um período que variou entre 1 e 2 horas.

Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas, consistindo em quatro ciclos de 5 minutos com TBS-T, seguidos por uma lavagem final com TBS. Em seguida, realizamos a incubação com o anticorpo secundário fluorescente por 90 minutos, mantida à temperatura ambiente. A leitura e aquisição de imagens para as proteínas alvo foram realizadas utilizando-se o sistema de fluorescência infravermelha Odyssey Fc System (LI-COR).

Os anticorpos utilizados foram: SERCA2 ATPASE (MA-919, Thermo Fisher); Antitrocador Sódio/Cálcio (MA3-926, Thermo Fisher); Anti-fosfolambam (MA3-922, Thermo Fisher); Anti-fosfo-fosfolambam (711401, Thermo Fisher); Goat anti-mouse IgG; e Goat anti-rabbit IgG. A expressão proteica foi quantificada de maneira semi-quantitativa, realizando-se a análise densitométrica das bandas obtidas no Western Blot. Para esta análise, foi utilizado o software ImageJ (National Institutes of Health, EUA).

4.4 Cálculo amostral e análise estatística

O tamanho da amostra foi calculado baseando-se na fração de ejeção de um estudo anterior.³⁸ Com base na diferença observada entre o grupo controle (63,4%) e o grupo tumoral (46,6%), e um desvio padrão de 2,5% no grupo com maior variabilidade, o cálculo estatístico (teste t bicaudal, G*Power) indicou um tamanho mínimo de amostra de 2 animais por grupo, garantindo 80% de poder e um nível de significância de 5%. No entanto, o número final de animais foi aumentado para atender

aos requisitos metodológicos. Esse aumento foi necessário para garantir que cada análise realizada, incluindo estudos histológicos e moleculares, tivesse um número adequado de amostras, geralmente >5 por grupo, e para compensar o risco de perdas de amostra associadas à agressividade do modelo de câncer de pulmão.⁷² O número total de 28 animais por grupo, maior que o mínimo, forneceu poder estatístico robusto para detectar diferenças significativas tanto na variável primária quanto nas múltiplas variáveis avaliadas.

Inicialmente foi empregado o teste de Shapiro-Wilk para verificação da distribuição dos dados. Posteriormente, os resultados foram apresentados como média e desvio padrão da média ou mediana e intervalo interquartílico, de acordo com a distribuição de dados estabelecidas pelo teste de Shapiro-Wilk. Diferenças entre grupos dentro da normalidade num único momento foram testadas pelo Teste T para medidas não pareadas. Diferenças entre grupos ao longo do estudo foram verificadas pela ANOVA de dois caminhos para medidas repetidas. Para dados que não seguiram uma distribuição normal, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. No caso de diferença significativa para dados dentro da normalidade foi usado o teste *post-hoc* de Tukey. Foi aceita uma diferença significante com $P < 0,05$. Os dados foram processados e analisados com o auxílio dos softwares STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc., Oklahoma, EUA) e Microsoft Excel (Washington, EUA)

5. RESULTADOS

No grupo controle, quatro camundongos foram excluídos. Três camundongos desenvolveram má oclusão e um morreu durante o teste de esforço máximo. No grupo com câncer, um camundongo morreu durante o teste de esforço máximo. Assim, 24 camundongos no grupo controle e 27 no grupo com câncer foram incluídos no estudo.

5.1 Peso Corporal

Os dados apresentados na Tabela 1 e Figura 2 mostram a evolução do peso corporal de camundongos que foram inoculados com células tumorais de câncer de pulmão e de camundongos saudáveis. O grupo com câncer tinha peso corporal significativamente menor na 1ª semana ($p=0,015$), 2ª semana ($p=0,040$) e 3ª semana ($p=0,043$) de estudo. Entretanto, a partir da 4ª semana, não houve diferença significativa no peso corporal entre os grupos. Peso corporal semelhante entre os

grupos também foi observado na pré eutanásia (Tabela 2, Figura 3).

Tabela 1. Peso corporal de camundongos saudáveis e camundongos inoculados com células de câncer de pulmão.

Semanas	Controle	Câncer	Valor P
1º semana (n=24/27)	26,68 (24,12;29,65)	25,34 (22,80;28,02)	0,015*
2º semana (n=24/27)	26,99 (24,38;29,81)	26,18 (23,42;28,46)	0,040*
3º semana (n=24/27)	27,55 (25,04;30,66)	26,58 (24,23;28,71)	0,043*
4º semana (n=20/23)	27,29 (25,55;30,49)	27,01 (24,93;28,94)	0,218
5º semana (n=17/17)	27,27 (26,06;30,76)	27,97 (25,80;29,84)	0,660
6º semana (n=9/10)	27,90 (26,02;30,88)	28,34 (25,92;30,60)	0,895
7º semana (n=4/4)	26,57 (25,98;27,86)	26,50 (25,97;28,88)	0,783

* = Diferença significativa. Mann-Whitney.

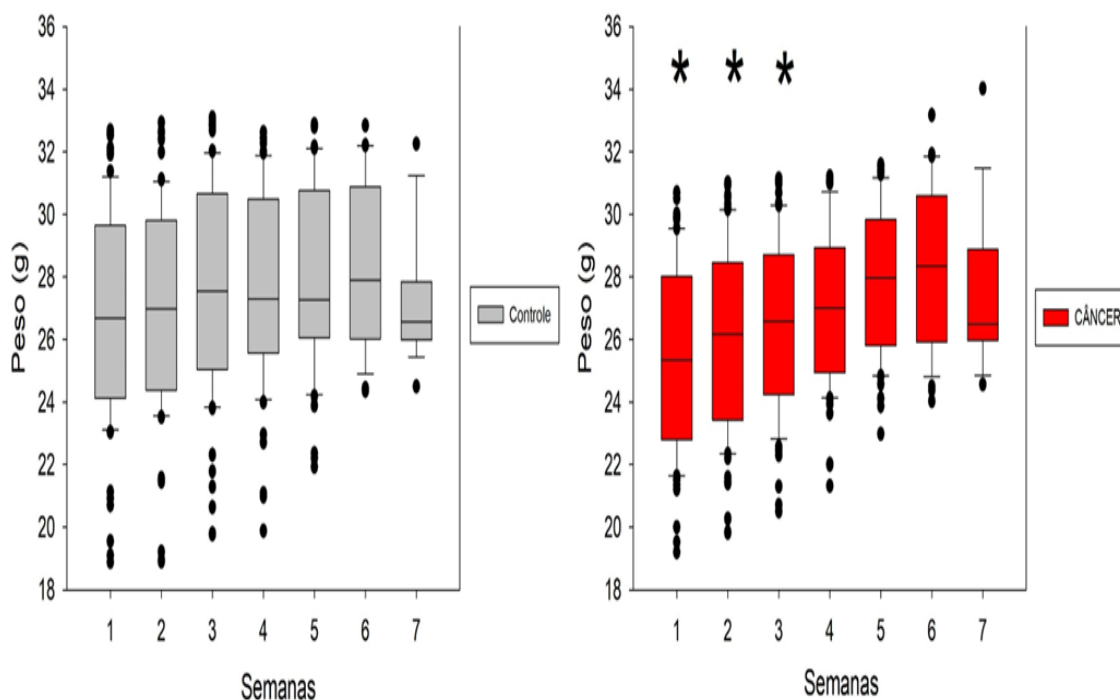


Figura 2 Peso corporal de camundongos saudáveis e camundongos inoculados com células de câncer de pulmão durante as semanas de estudo. * = Diferença significativa entre os grupos, Primeira semana $p=0,015$, Segunda semana $p=0,040$ e Terceira semana $p=0,043$. Mann-Whitney. Animais/grupo: 24 Controle, 27 Câncer.

Tabela 2. Peso corporal de camundongos saudáveis e camundongos inoculados com células de câncer de pulmão na pré eutanásia.

Variável	Controle (n=24)	Câncer (n=27)	Valor p
Peso (g)	28,23 ± 2,96	28,20 ± 2,48	0,962

Média Test T de *Student* não pareado.

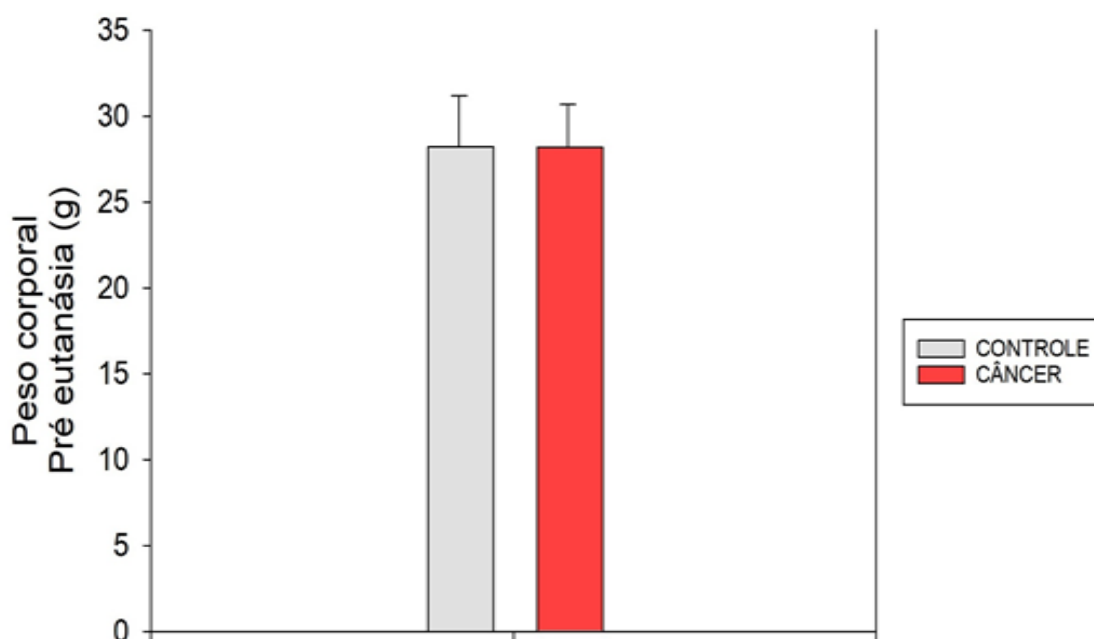


Figura 3. Peso corporal de camundongos saudáveis e camundongos inoculados com células de câncer de pulmão na pré eutanásia. Test T de *Student* não pareado. Animais/grupo: 24 Controle, 27 Câncer.

5.2 Peso dos órgãos

Apresentamos agora os achados do peso dos órgãos coletados. Os nossos dados mostram um aumento significativo no baço ($p < 0,001$), fígado ($p < 0,001$) e pulmão ($p < 0,001$) nos camundongos com câncer (Tabela 3 e Figura 4). Por outro lado, as análises não revelaram diferenças significativas entre os grupos estudados no coração e nos rins.

Tabela 3. Peso dos órgãos em camundongos saudáveis e camundongos inoculados com células de câncer de pulmão.

Órgãos	Controle (n=14)	Câncer (n=17)	Valor p
Baço (g/cm)	0,068 ± 0,009	0,164 ± 0,031	<0,001*

Coração (g/cm)	0,261 ± 0,004	0,258 ± 0,005	0,118
Fígado (g/cm)	0,895 ± 0,009	1,108 ± 0,041	<0,001*
Pulmão (g/cm)	0,111 ± 0,013	0,129 ± 0,013	<0,001*
Rins (g/cm)	0,268 ± 0,001	0,267 ± 0,002	0,227

Média ± Desvio padrão. * = Diferença significativa. Test T de *Student* não pareado.

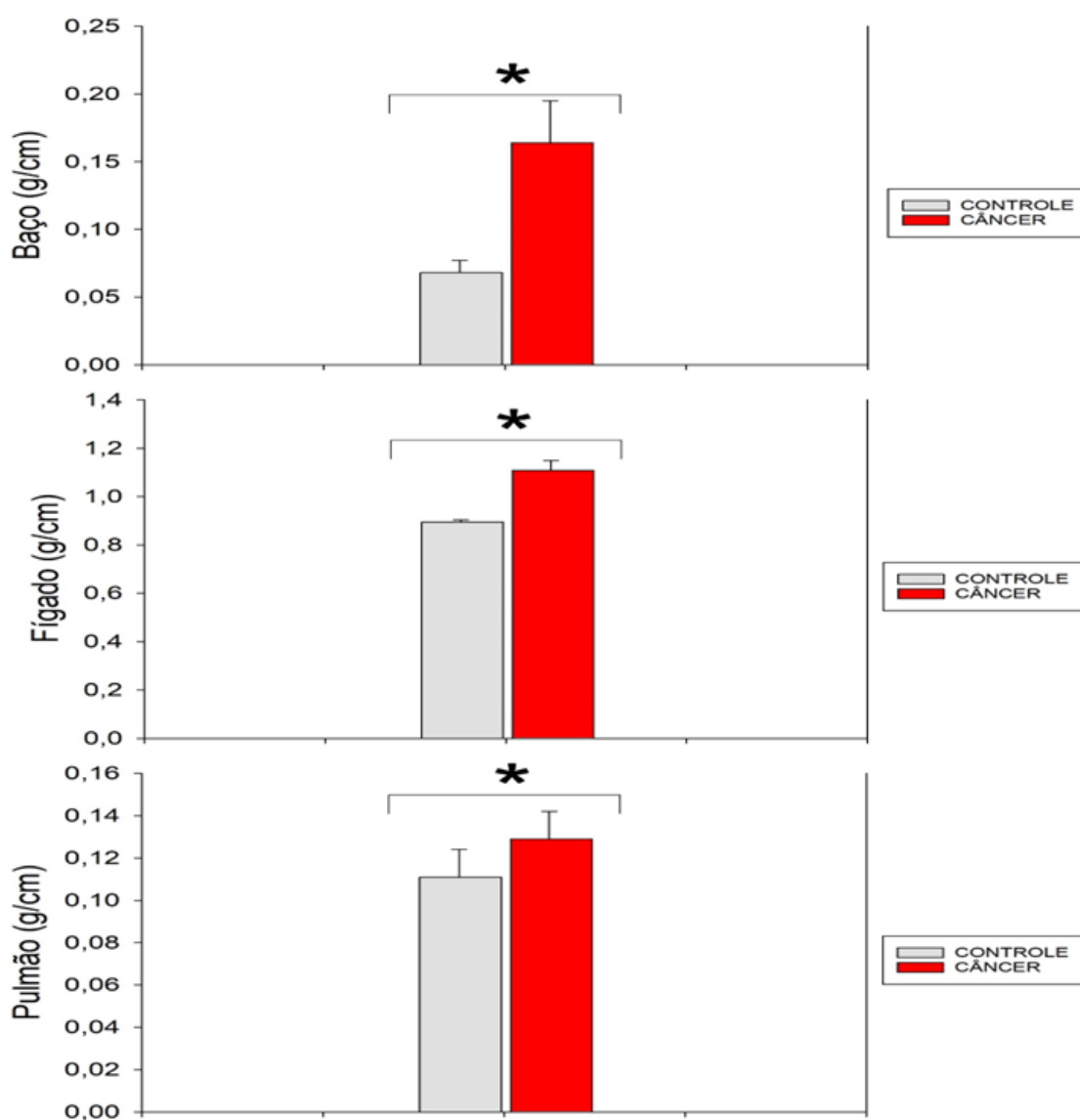


Figura 4. Peso do baço, fígado e pulmões em camundongos inoculados com células de câncer de pulmão e camundongos saudáveis.* = Diferença significativa. Baço $p < 0,001$, Fígado $p < 0,001$ e Pulmão $p < 0,001$ Test T de *Student* não pareado. Média ± Desvio padrão. Animais/grupo: 10 Controle, 14 Câncer.

5.3 Capacidade física

Em relação a capacidade física, podemos observar que o grupo inoculado com células de câncer de pulmão apresentou redução na distância percorrida (Interação, $p < 0,001$; Post hoc $p < 0,001$), a velocidade (Interação, $p < 0,001$; Post hoc $p < 0,001$) e o tempo de execução (Interação, $p < 0,001$; Post hoc $p < 0,001$) quando comparado com o grupo controle (Tabela 4, Figura 5).

Tabela 4. Capacidade física em camundongos inoculados com células de câncer de pulmão e camundongos saudáveis.

Variável	Controle (n=24)		Câncer (n=27)		P Grupo	P Tempo	P Interação
	Pré	Pós	Pré	Pós	-	-	-
Distância (m)	663,00 ± 61,08	663,24 ± 64,02	641,93 ± 53,41	484,78 ± 96,97	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*
Tempo (min)	32,43 ± 1,65	32,56 ± 1,97	31,96 ± 1,58	27,02 ± 2,97	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*
Velocidade (m/min)	36,37 ± 1,84	37,00 ± 1,69	36,55 ± 1,67	32,00 ± 2,50	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*

Média ± Desvio padrão. * = Diferença significativa. ANOVA medidas repetidas. Teste post hoc de Tukey. Distância percorrida (Post hoc $p < 0,001$), velocidade (Post hoc $p < 0,001$) e tempo de execução (Post hoc $p < 0,001$). Animais/grupo: 24 Controle, 27 Câncer.

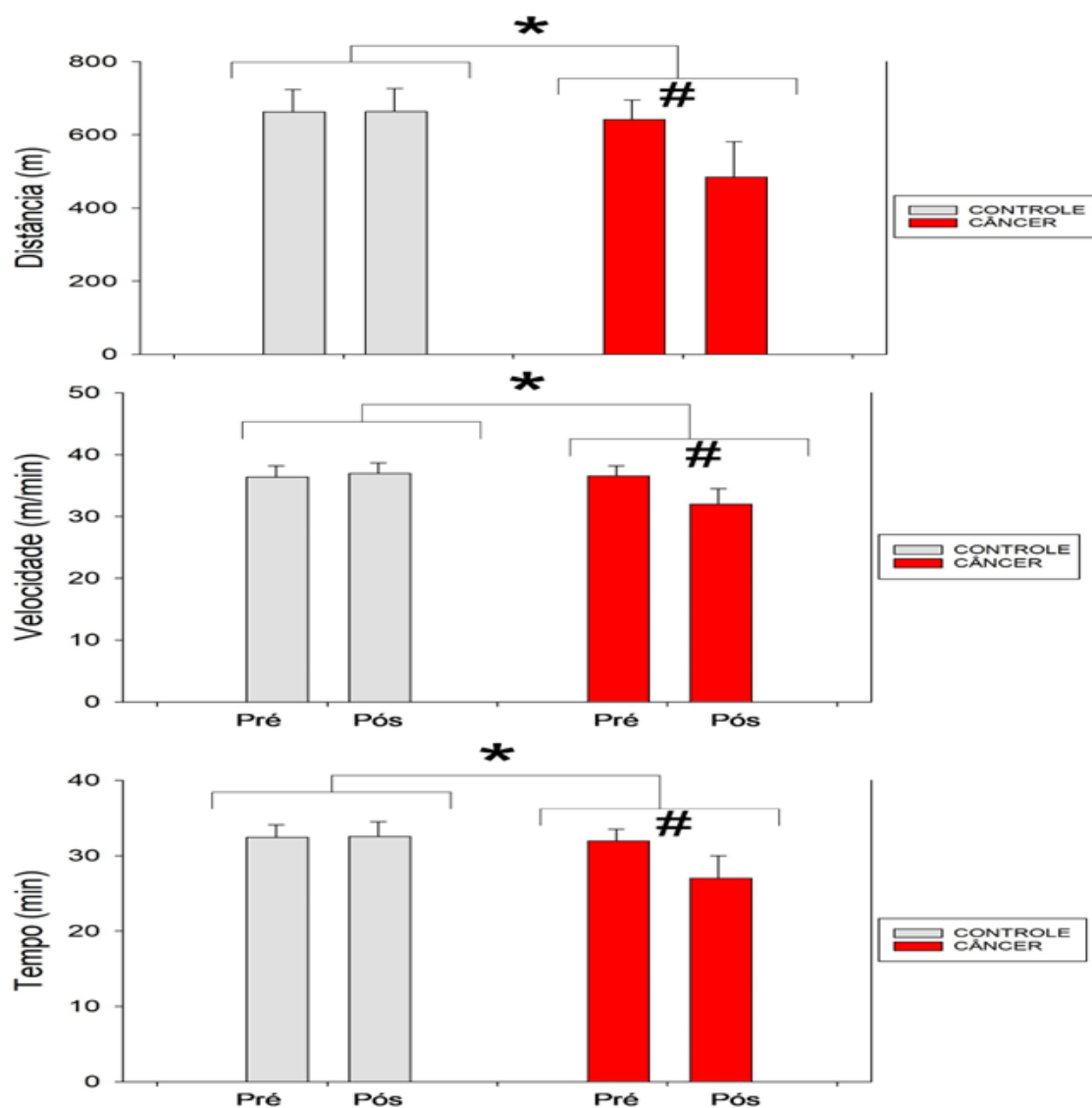


Figura 5. Capacidade física em camundongos inoculados com células de câncer de pulmão e camundongos saudáveis. Média $\pm$ Desvio padrão. ANOVA medidas repetidas. Teste post hoc de Tukey.

#Diferença intragrupo; *Diferença intergrupo.. Distância percorrida (Interação $p < 0,001$, Post hoc $p < 0,001$), Velocidade (Interação $p < 0,001$, Post hoc $p < 0,001$) e Tempo de execução (Interação $p < 0,001$, Post hoc $p < 0,001$). Animais/grupo: 24 Controle, 27 Câncer.

5.4 Morfologia e Função Cardíaca

A avaliação ecocardiográfica mostrou redução significativa na fração de ejeção do ventrículo esquerdo no grupo câncer em comparação com o grupo controle (Grupo $p = 0,007$) (Tabela 5 e Figura 6). Na comparação intragrupo observou-se um aumento na onda E no grupo câncer ($p = 0,011$) (Tabela 5). Análises adicionais de speckle-tracking não mostraram diferenças significativas entre os camundongos com câncer e os camundongos saudáveis (Tabela 5).

Tabela 5. Morfologia e função cardíaca em camundongos inoculados com células de câncer de pulmão e camundongos saudáveis.

Variável	Controle (n=24)		Câncer (n=27)		P Grupo	P Tempo	P Interação	P (Mediana)
Volumes	Pré	Pós	Pré	Pós	-	-	-	
VDF (ul)	2,76 ± 0,64	2,65 ± 0,57	2,92 ± 0,75	2,97 ± 0,52	0,797	0,071	0,540	-
VSF (ul)	1,12 ± 0,22	1,09 ± 0,25	1,32 ± 0,34	1,20 ± 0,29	0,009	0,166	0,463	-

Morfologia	Pré	Pós	Pré	Pós	P Grupo	P Tempo	P Interação	P (Mediana)
SIV (mm)	0,86 ± 0,13	0,91 ± 0,10	0,82 ± 0,13	0,84 ± 0,12	0,052	0,186	0,664	-
Massa VE (mg)	3,53 ± 0,61	3,47 ± 0,46	3,52 ± 0,55	3,76 ± 0,62	0,239	0,421	0,197	-
DDFVE (mm)	0,154 ± 0,02	0,147 ± 0,02	0,160 ± 0,02	0,153 ± 0,01	0,145	0,124	0,992	-
DSFVE (mm)	0,107 ± 0,01	0,102 ± 0,01	0,115 ± 0,02	0,106 ± 0,01	0,144	0,080	0,616	-

Funcional	Pré	Pós	Pré	Pós	P Grupo	P Tempo	P Interação	P (Mediana)
FE (%)	59,76 ± 9,55	58,58 ± 9,58	54,47 ± 10,18	53,90 ± 6,43	0,007*	0,629	0,866	-
FS (%)	30,68 ± 7,55	30,92 ± 7,42	28,54 ± 7,44	30,47 ± 6,00	0,447	0,365	0,554	-
Onda A (mm/s)	333,01 ± 116,08	319,76 ± 88,37	325,54 ± 101,50	334,50 ± 103,07	0,866	0,920	0,605	-
Onda E (mm/s)	639,15 ± 89,23	574,42 ± 83,68	660,91 ± 113,70	737,21 ± 200,43	0,833	0,001	0,011#	-
E/A (cm/s)	1,91 ± 0,50	1,85 ± 0,53	2,09 ± 0,39	2,05 ± 0,55	0,577	0,060	0,941	-
Mv des Ec (ms) Mediana (IQR)	1,77 (1,45; 2,17)	-	1,72 (1,31; 2,01)	-	-	-	-	0,366
Mv des Ec (ms) Mediana (IQR)	-	1,76 (1,26; 2,00)	-	1,66 (1,46; 2,19)	-	-	-	0,698
e' (mm/s) Mediana (IQR)	-21,35 (-18,70; -26,57)	-	-21,65 (-17,44; -24,12)	-	-	-	-	0,485

e' (mm/s) Mediana (IQR)	-	-20,85 (-17,04; -27,87)	-	-23,86 (-20,05; -30,08)	-	-	-	0,097
E/e' (cm/s)	29,35 ± 5,20	31,25 ± 7,53	27,50 ± 7,37	23,64 ± 8,21	0,227	0,378	0,945	-
TRIVc (ms)	1,53 ± 0,27	1,50 ± 0,30	1,53 ± 0,28	1,48 ± 0,32	0,489	0,850	0,830	-
TCI (ms)	15,52 ± 3,59	16,08 ± 3,65	15,91 ± 3,24	17,65 4,02	0,200	0,132	0,435	-
TE (ms)	50,93 ± 5,19	48,99 ± 5,97	53,28 ± 5,88	51,64 ± 7,39	0,055	0,168	0,907	-
IPM	0,33 ± 0,07	0,36 ± 0,08	0,33 ± 0,06	0,37 ± 0,09	0,850	0,027	0,604	-
ECC Strain (%)	-13,42 ± 2,07	-15,35 ± 4,74	-12,41 ± 4,70	-15,60 ± 4,09	0,575	0,002	0,394	-
ECC SR (S ⁻¹)	-4,23 ± 1,22	-4,57 ± 1,66	-3,66 ± 1,20	-4,96 ± 1,64	0,765	0,007	0,110	-
ELL Strain %	-10,42 (12,59; 7,61)	-	-8,22 (12,18; 6,86)	-	-	-	-	0,341
ELL Strain %	-	-8,67 (-10,28; -7,32)	-	-11,24 (-14,54; -8,15)	-	-	-	0,116
ELL SR (S ⁻¹) Median (IQR)	-3,13 (-4,20; -2,57)	-	-2,78 (-4,37; -2,24)	-	-	-	-	0,361
ELL SR (S ⁻¹) Mediana (IQR)	-	-2,89 (-3,33; -2,10)	-	-3,53 (-4,93; -2,83)	-	-	-	0,113
ELR Strain (%) Mediana (IQR)	11,96 (7,94; 15,21)	-	11,55 (8,84; 14,13)	-	-	-	-	0,756
ELR Strain (%) Mediana (IQR)	-	12,48 (9,99; 15,16)	-	12,83 (7,56; 16,65)	-	-	-	0,846
ELR SR (S ⁻¹) Mediana (IQR)	3,40 ± 1,24	3,22 ± 1,01	3,26 ± 1,18	3,59 ± 1,48	0,643	0,772	0,318	-
ECR Strain (%) Mediana (IQR)	13,57 (10,75; 18,28)	-	10,42 (5,05; 18,37)	-	-	-	-	0,437
ECR Strain (%) Mediana (IQR)	-	14,82 (5,92; 22,70)	-	17,53 (11,01; 25,40)	-	-	-	0,221

ECR SR (S ⁻¹)	3,97		3,31					
Mediana (IQR)	(3,17; 4,62)	-	(2,53; 4,46)	-	-	-	-	0,107
ECR SR (S ⁻¹)		4,40		4,37				
Mediana (IQR)	-	(3,30; 5,16)	-	(3,43; 5,79)	-	-	-	0,846
FC (bpm)	377,62 ± 59,4	394,29 ± 42,1	381,46 ± 70,4	421,92 ± 54,6	0,177	0,015	0,306	-
Intervalo R-R (ms)	158,00 (139,25; 171,50)	-	155,00 (141,50 ; 183,00)	-	-	-	-	0,705
Intervalo R-R (ms)	-	152,00 (138,50 ; 167,25)	-	139,00 (125,00 ; 156,50)	-	-	-	0,052
Mediana (IQR)								

DDFVE (Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo); DSFVE (Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo); E/A (Relação onda E/Onda A); E/e' (Relação Onda E/ Velocidade de relaxamento miocárdico do anel mitral na fase de enchimento ventricular precoce); ECC strain e strain rate (eixo curto circunferencial strain e strain rate); ECR strain e strain rate (eixo curto radial strain e strain rate); ELR strain e strain rate (eixo longo radial strain e strain rate); ELL strain e strain rate (eixo longo longitudinal strain e strain rate); FC (Frequência cardíaca); FE (Fração de ejeção); FS (Fração de encurtamento); IPM (Índice de performance miocárdica); MassaVE (Massa do ventrículo esquerdo); Mv des. E (Tempo de desaceleração da onda E); Onda A (Pico de velocidade do fluxo transmitral durante a contração atrial); Onda E (Velocidade do fluxo mitral na fase de enchimento ventricular precoce); TRIVc (Tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido pelo peso); VDF (Volume diastólico final do ventrículo esquerdo); VSF (Volume sistólico final do ventrículo esquerdo). Média. ± Desvio padrão. ANOVA medidas repetidas. Teste post hoc de Tukey. Fração de ejeção (Grupo = 0,007). Onda E (Post hoc p<0,001). *Diferença intergrupo; #Diferença intragrupo. Mediana e intervalos interquartis(IQR). Mann-Whitney.

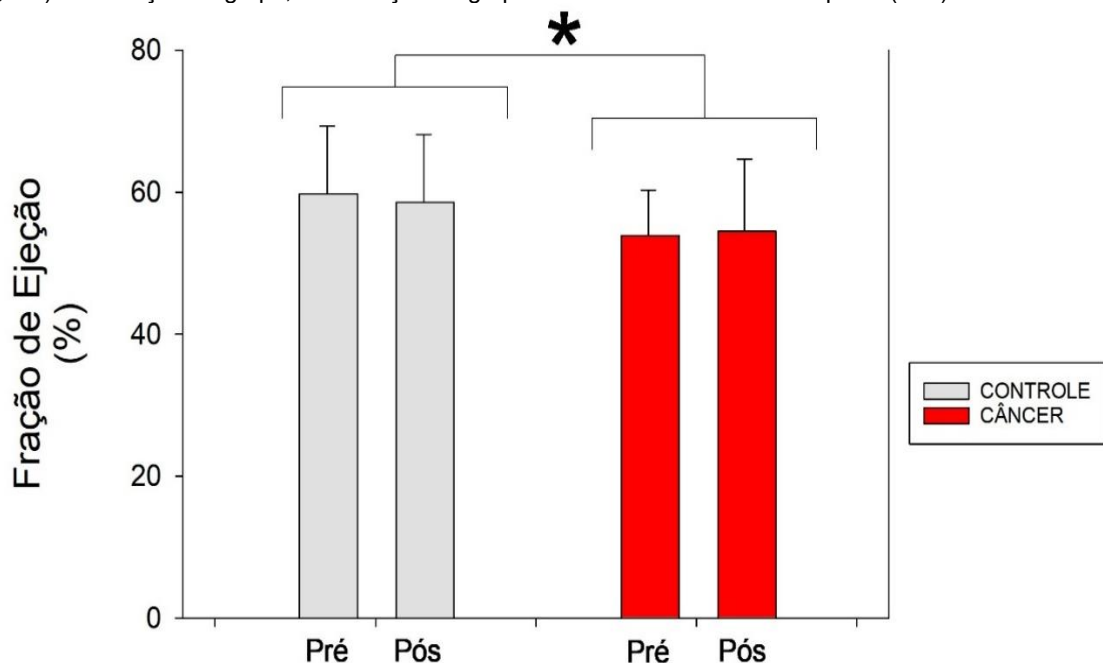


Figura 6. Fração de ejeção em camundongos inoculados com células de câncer de pulmão e camundongos saudáveis. * = Diferença significativa (Grupo p = 0,007). Animais/grupo: 24 Controle, 26 Câncer.

5.5 Transiente de Cálcio

A análise do transiente de cálcio evidencia que os camundongos com câncer têm redução significativa nos níveis basais de cálcio (0,5Hz $p < 0,001$; 3,0Hz $p < 0,001$), velocidade de liberação de cálcio (0,5Hz $p < 0,001$; 3,0Hz $p < 0,001$), amplitude do sinal de cálcio (0,5Hz $p = 0,050$; 3,0Hz $p < 0,001$) e velocidade de absorção de cálcio (0,5Hz $p < 0,001$; 3,0Hz $p < 0,001$) (Tabela 6; Figuras 7, 8, 9 e 10 respectivamente).

Tabela 6. Níveis basais de cálcio, velocidade de liberação de cálcio, amplitude do sinal de cálcio e velocidade de recaptação de cálcio e níveis de cálcio no cardiomiócito em camundongos inoculados com células de câncer de pulmão e camundongos saudáveis.

Parâmetros	Controle	Câncer	Valor p
-	Mediana (IQR)	Mediana (IQR)	-
Ca ²⁺ Baseline 0,5 Hz	0,853 (0,784;0,893)	0,631 (0,514;0,825)	<0,001*
Ca ²⁺ Baseline 3,0 Hz	0,857 (0,786;0,896)	0,623 (0,518;0,708)	<0,001*
Velocidade de liberação de Ca ²⁺ 0,5 Hz	1,550 (1,170;2,421)	1,048 (0,438;1,883)	<0,001*
Velocidade de liberação de Ca ²⁺ 3,0 Hz	1,571 (1,207;2,280)	0,833 (0,302;1,334)	<0,001*
Amplitude de Ca ²⁺ 0,5 Hz	6,938 (5,777;9,717)	6,667 (3,552;9,557)	0,050*
Amplitude de Ca ²⁺ 3,0 Hz	1,571 (1,207;2,280)	0,833 (0,302;1,334)	<0,001*
Velocidade de absorção de Ca ²⁺ 0,5 Hz	-0,337 (-0,513;-0,291)	-0,217 (-0,425;-0,122)	<0,001*
Velocidade de absorção de Ca ²⁺ 3,0 Hz	-0,470 (-0,669;-0,371)	-0,252 (-0,428;-0,128)	<0,001*

Mediana e intervalos interquartis. Mann-Whitney. * = Diferença significativa.

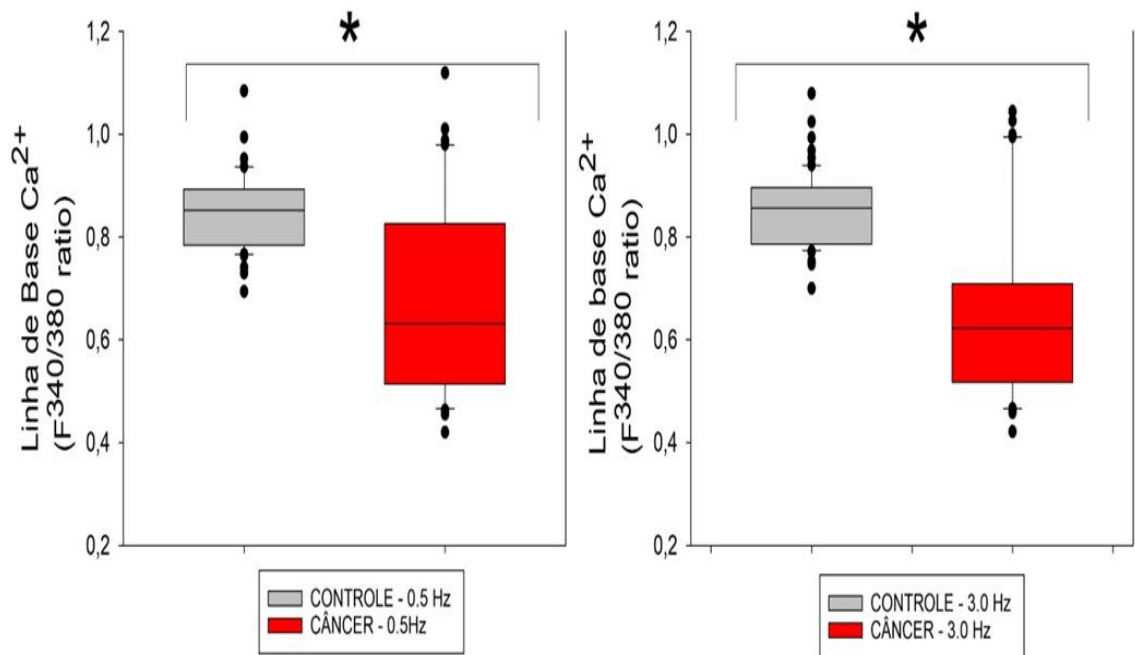


Figura 7. Níveis basais de cálcio com estimulação de 0,5 e 3,0Hz. Mann-Whitney.*= Diferença significativa (0,5Hz $p < 0,001$; 3,0Hz $p < 0,001$). Cardiomiócitos/grupo: 60 Controle, 50 Câncer.

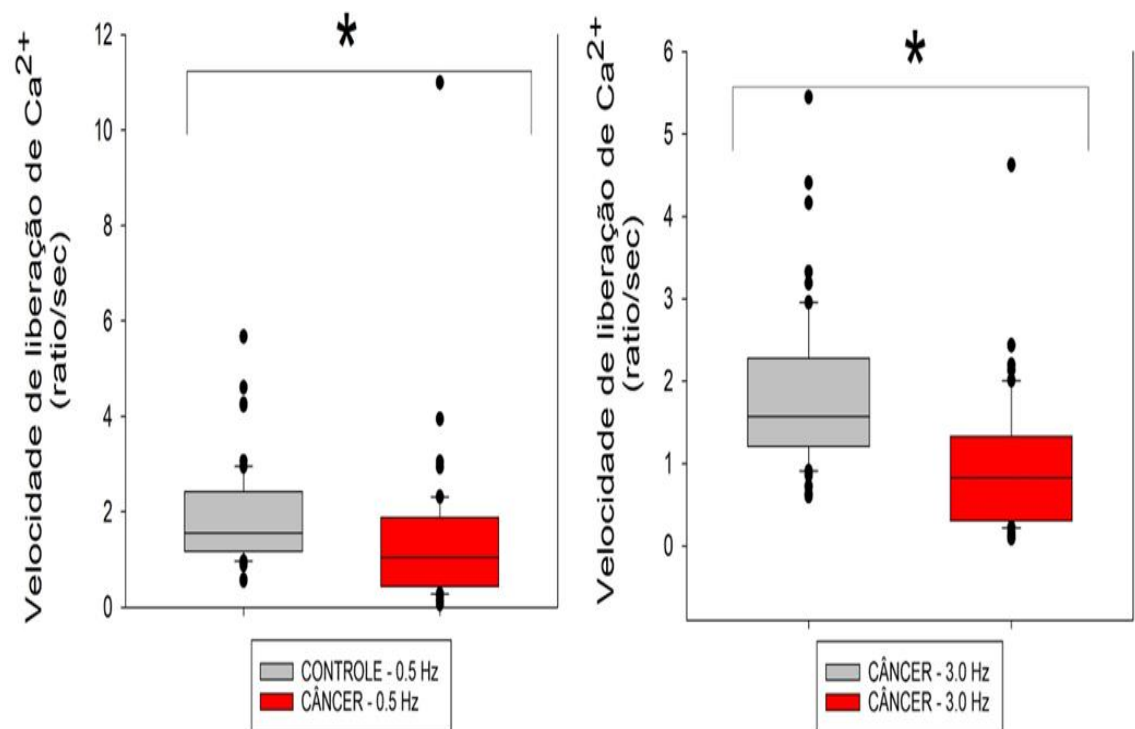


Figura 8. Velocidade de liberação de cálcio com estimulação de 0,5 e 3,0Hz. Mann-Whitney.*= Diferença significativa (0,5Hz $p < 0,001$; 3,0Hz $p < 0,001$). Cardiomiócitos/grupo: 60 Controle, 50 Câncer.

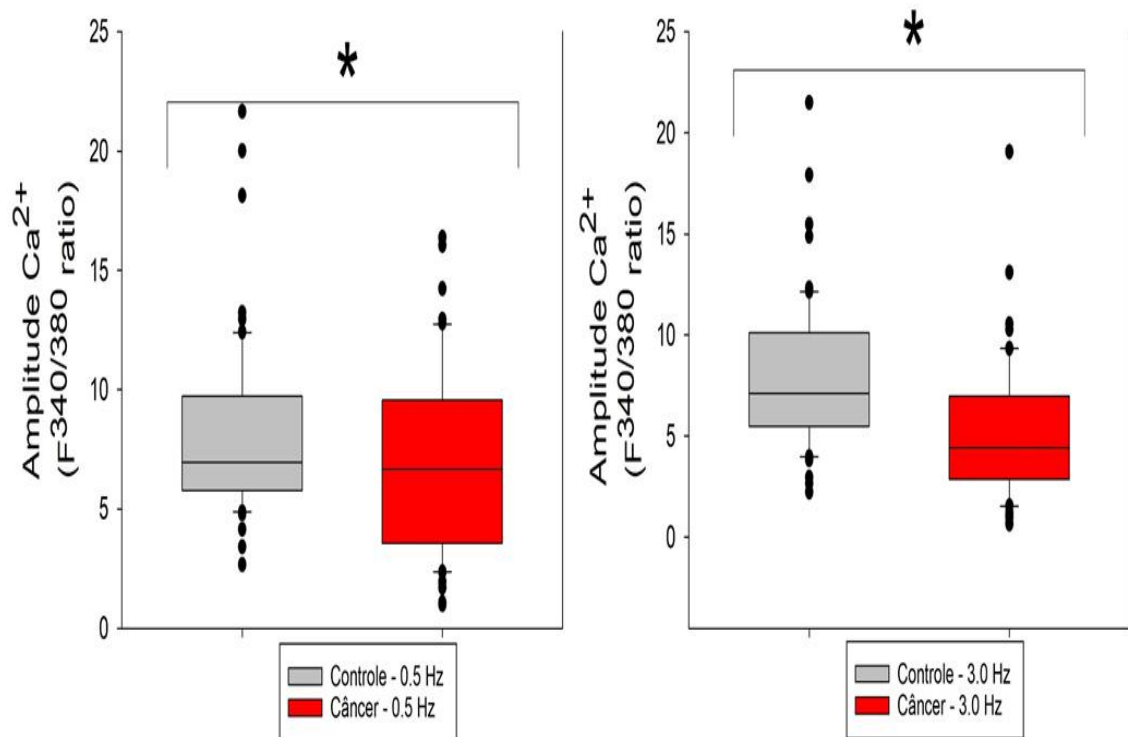


Figura 9. Amplitude de cálcio com estimulação de 0,5 e 3,0Hz. Mann-Whitney. * = Diferença significativa (0,5Hz $p < 0,050$; 3,0Hz $p < 0,001$). Cardiomiócitos/grupo: 60 Controle, 50 Câncer.

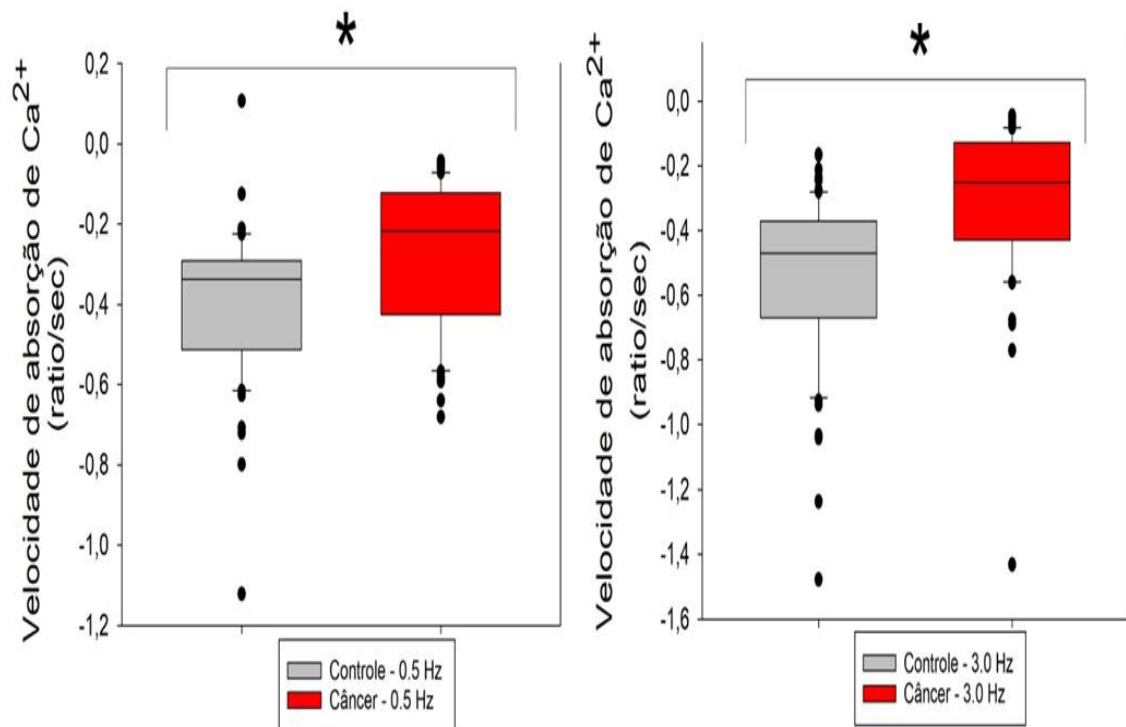


Figura 10. Velocidade de absorção de cálcio com estimulação de 0,5 e 3,0Hz. Mann-Whitney. * = Diferença significativa (0,5Hz $p < 0,001$; 3,0Hz $p < 0,001$). Cardiomiócitos/grupo: 60 Controle, 50 Câncer.

Além desses resultados observamos que o tempo para atingir 50% do encurtamento máximo do cardiomiócito estava significativamente reduzido no grupo inoculado com câncer de pulmão em comparação com os camundongos saudáveis (Figura 11).

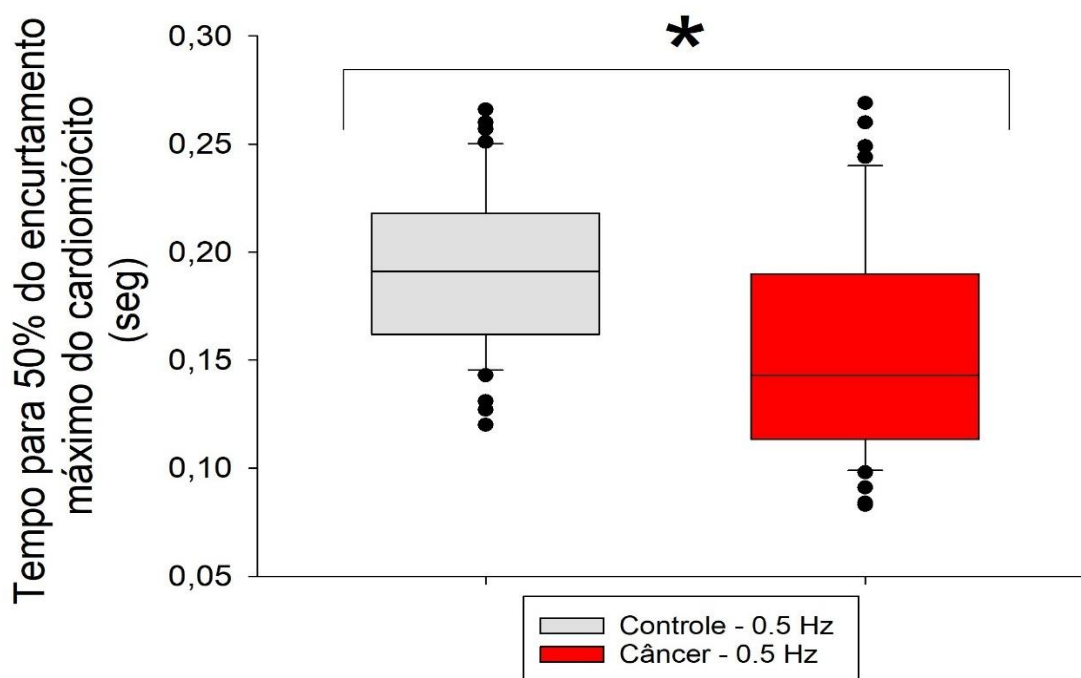


Figura 11. Tempo para alcançar 50% do encurtamento máximo do cardiomiócito com estimulações de 0,5Hz. *Diferença Intergrupo ($p < 0,05$) Mann-Whitney. Cardiomiócitos/grupo: 60 Controle, 50 Câncer.

Não foram verificadas diferenças significativas no comprimento do sarcômero, encurtamento do sarcômero, velocidade de encurtamento do sarcômero e tempo para atingir 50% da contração máxima do sarcômero (Tabela 7). Resultados semelhantes foram verificados no cardiomiócito. Não foram verificadas diferenças significativas no encurtamento do cardiomiócito, velocidade de contração do cardiomiócito e tempo para atingir 50% da contração máxima do cardiomiócito (Tabela 8).

Tabela 7. Comprimento do sarcômero, encurtamento do sarcômero, velocidade de encurtamento do sarcômero e tempo para atingir 50% da contração máxima do sarcômero.

Parâmetros	Controle	Câncer	Valor p
-	Mediana (IQR)	Mediana (IQR)	-

Comprimento do Sarcômero 0,5Hz	3,752 (3,688;3,854)	3,783 (3,682;3,901)	0,523
Comprimento do Sarcômero 3,0Hz	3,696 (3,646;3,776)	3,692 (3,564;3,810)	0,744
Encurtamento do Sarcômero 0,5Hz	6,921 (5,357;9,230)	8,202 (5,675;10,177)	0,212
Encurtamento do Sarcômero 3,0Hz	9,099 ± 4,513	9,122 ± 4,453	P= 0,978
Velocidade de encurtamento do sarcômero 0,5Hz	-4,498 (-5,553;-3,321)	-5,525 (-6,831;-3,613)	0,059
Velocidade de encurtamento do sarcômero 3,0 Hz	-6,078 ± 3,102	-6,272 ± 3,153	P= 0,747
Tempo para 50% da contração máxima do sarcômero 0,5Hz	0,0405 (0,0390;0,0440)	0,0400 (0,0360;0,0440)	0,223
Tempo para 50% da contração máxima do sarcômero 3,0Hz	0,0380 (0,0350;0,0408)	0,0370 (0,0340;0,0410)	0,763

Mediana e intervalos interquartis. Mann-Whitney. Média ± Desvio padrão. Teste *t* de Student não pareado.

Tabela 8 Encurtamento do cardiomiócito, velocidade de contração do cardiomiócito e tempo para atingir 50% da contração máxima do cardiomiócito

Parâmetros	Controle	Câncer	Valor <i>p</i>
-	Mediana (IQR)	Mediana (IQR)	-
Encurtamento do cardiomiócito 0,5Hz	4,469 (2,705;6,242)	3,739 (2,204;7,098)	0,586
Encurtamento do cardiomiócito 3,0Hz	5,154 (1,650;7,884)	3,147 (1,180;7,972)	0,359
Velocidade de contração do cardiomiócito 0,5Hz	-134,930 (-222,602;-59,764)	-135,637 (-284,504;-78,305)	0,285
Velocidade de contração do cardiomiócito 0,5Hz	-185,573 (-286,652;-57,052)	-166,762 (318,769;-53,969)	0,934
Tempo para 50% da contração máxima do	0,191 (0,162;0,218)	0,143 (0,114;0,190)	<0,001*

cardiomiócito
0,5Hz

Tempo para 50% da contração máxima do cardiomiócito 3,0Hz	0,175 (0,141;0,214)	0,138 (0,0775;0,200)	0,091
---	------------------------	-------------------------	-------

Mediana e intervalos interquartis. Mann-Whitney.

5.6 Análise histológica

Conforme apresentado na Tabela 9 e na Figura 12, não foi encontrada diferença significativa no diâmetro do cardiomiócito entre os grupos. Contudo, houve uma forte tendência a aumento na área de fração de colágeno no grupo câncer (Tabela 10, Figura 13, $p=0.062$).

Tabela 9. Parâmetros avaliados através da microscopia óptica para variáveis como área de fração de colágeno e diâmetro do cardiomiócito.

Parâmetros	Controle (n=6)	Câncer (n=7)	Valor <i>p</i>
-	Mediana (IQR)	Mediana (IQR)	-
Área de fração de colágeno	2,71 (2,32;3,09)	2,90 (2,43;3,23)	0,062
Diâmetro do miócito	14,85 (13,50;16,23)	14,72 (13,28;16,43)	0,686

Mediana e intervalos interquartis. Mann-Whitney.

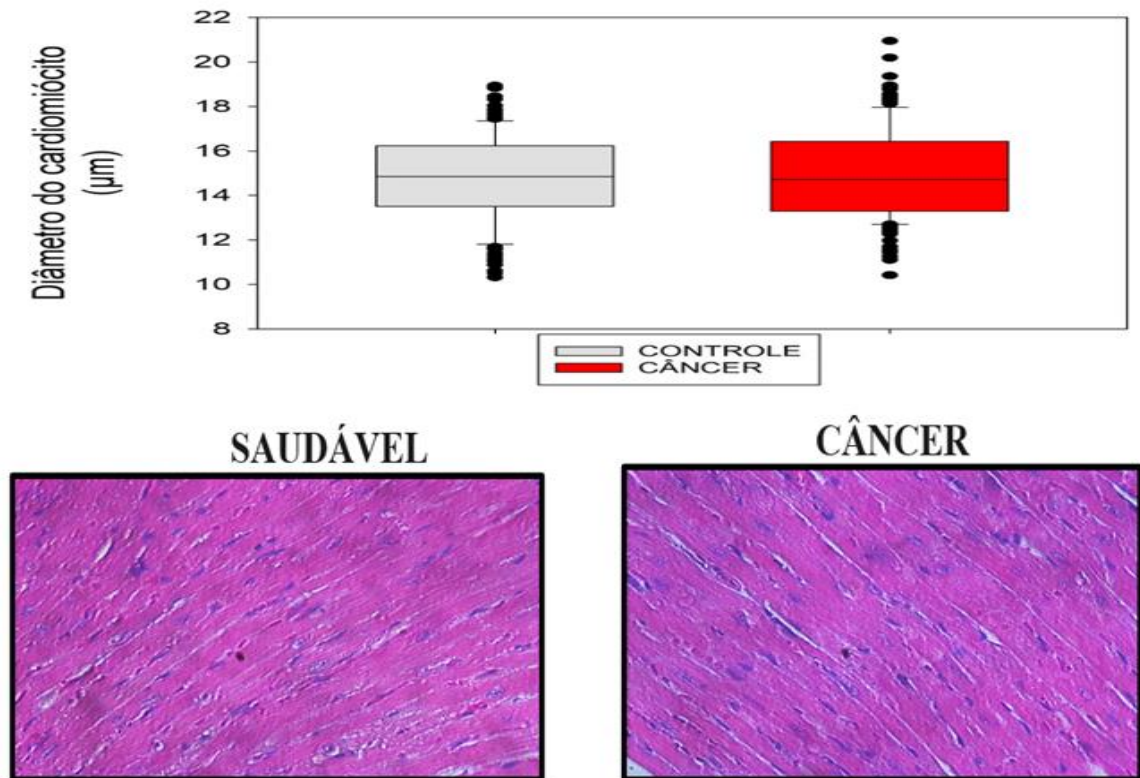


Figura 12. Diâmetro do cardiomiócito em camundongos com câncer de pulmão e camundongos saudáveis. Mann-Whitney. Animais/grupo: Controle 6; Câncer 7.

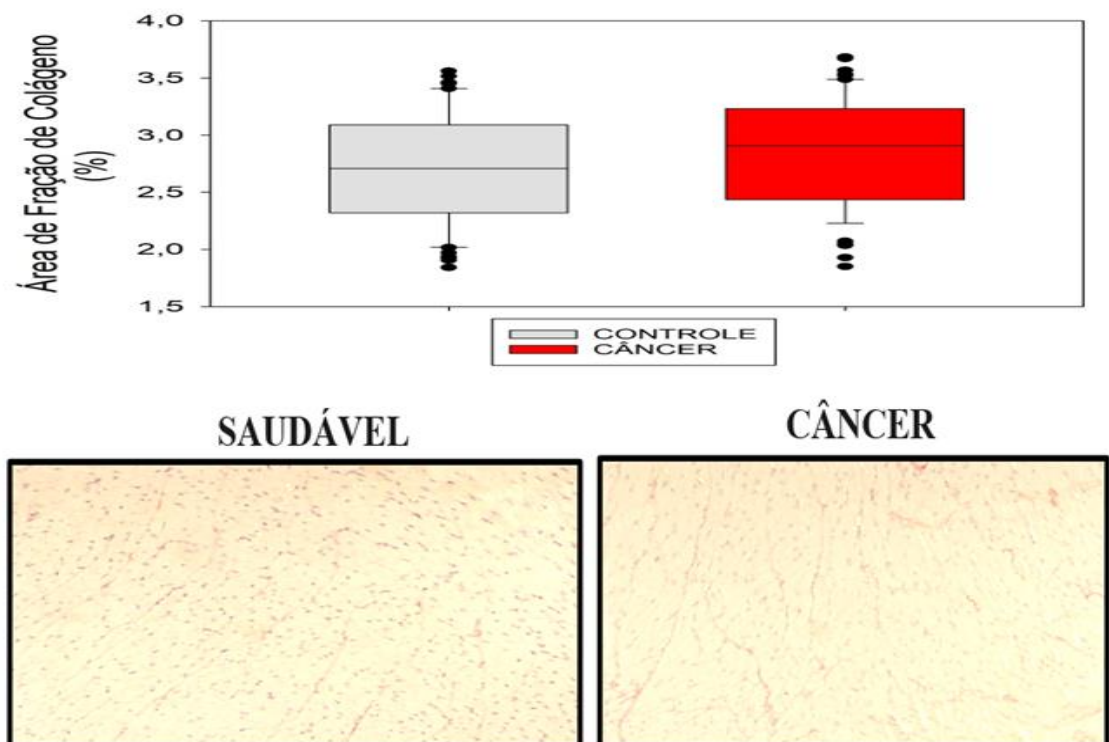


Figura 13. Área de fração de colágeno em camundongos com câncer de pulmão e camundongos saudáveis. Mann-Whitney. Animais/grupo: Controle 6; Câncer 7.

5.7 Alterações Moleculares Cardíacas

Ao investigarmos as proteínas essenciais envolvidas na contração e no relaxamento cardíaco, nossos dados mostram um aumento significativo na expressão do trocador sódio/cálcio (NCX, $p=0,009$) e fosfolamban (PLB, $p=0,039$) nos camundongos inoculados com câncer quando comparados aos saudáveis, conforme demonstrado na Figura 14. Não foram observadas diferenças significativas na expressão da ATPase 2 do retículo sarcoplasmático de cálcio (SERCA2a, $p=0,328$) e do fosfolamban fosforilado (p-PLB, $p = 0,187$), conforme demonstrado na Figura 15. Ao analisarmos a relação SERCA/PLB ($p=0,004$) e SERCA/NCX($p=0,023$) ambas apresentaram reduções significativas nos camundongos com câncer, conforme demonstrado na Figura 16.

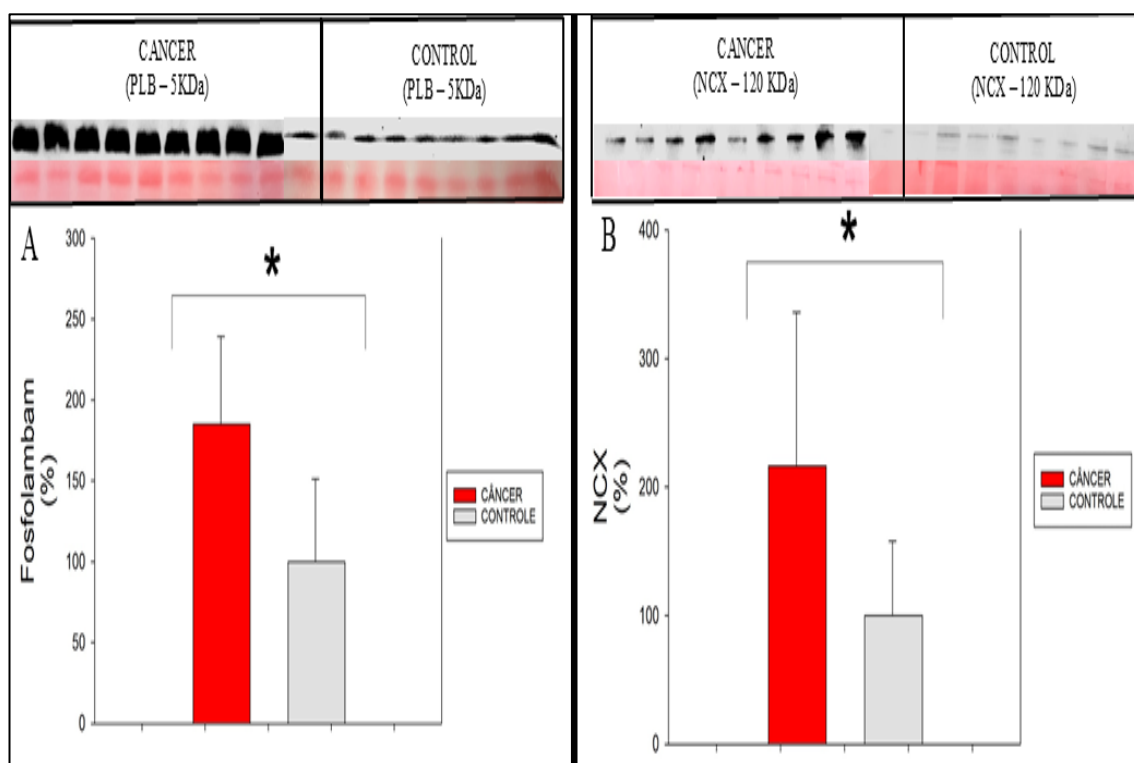


Figura 14. Quantificação de proteínas Fosfolamban e NCX reguladoras do cálcio no coração. Test T de Student não pareado. * = Diferença significativa NCX ($p=0,023$), PLB ($p=0,004$). Média $\pm$ Desvio padrão. Animais/grupo: 8 Controle, 10 Câncer.

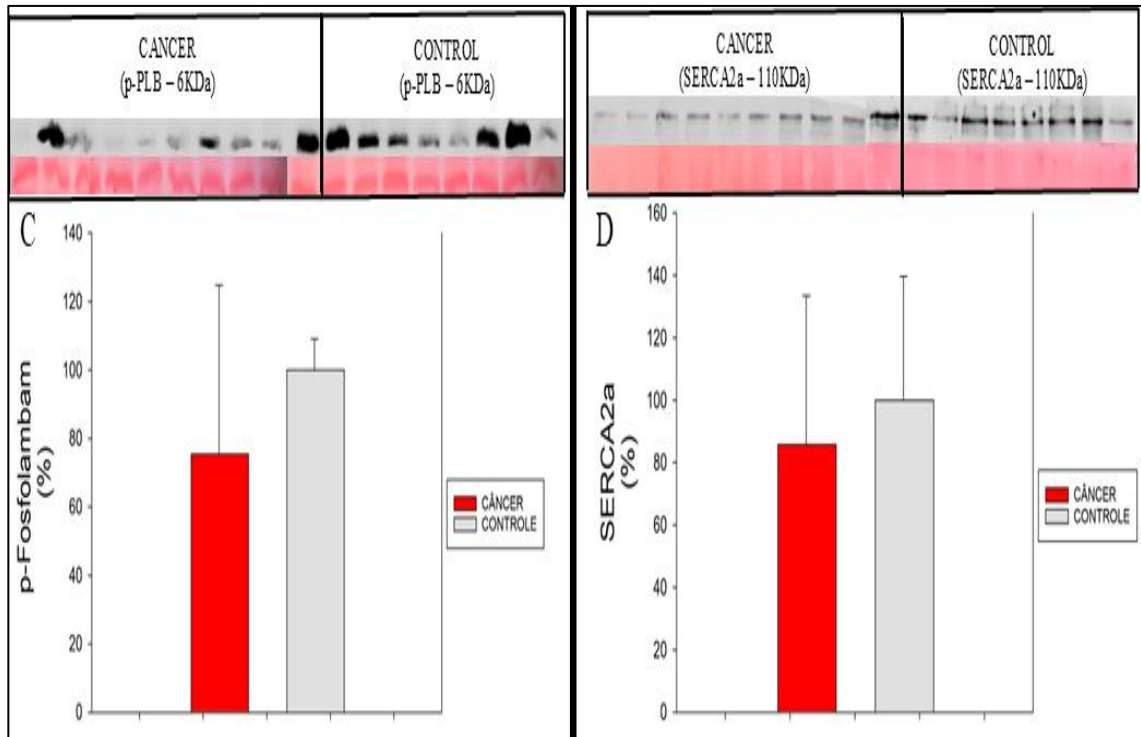


Figura 15. Quantificação de proteínas p-PLB e SERCA, reguladoras do cálcio no coração. Test T de Student não pareado. Animais/grupo: 8 Controle, 10 Câncer.

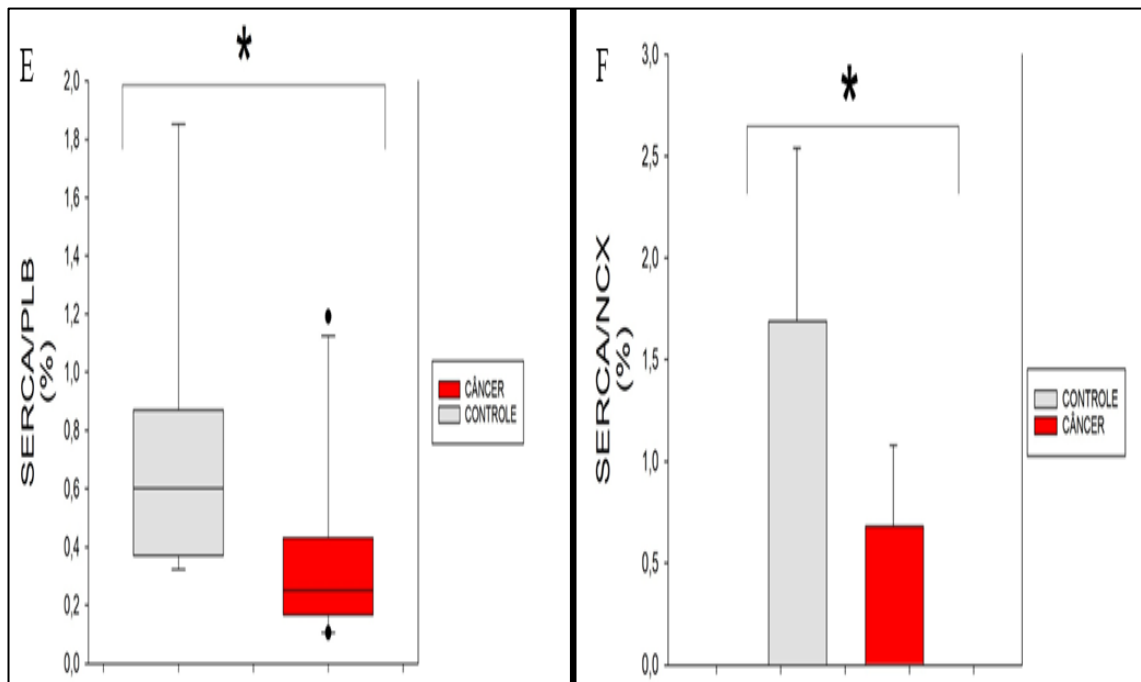


Figura 16. Relação de proteínas SERCA/PLB e SERCA/NCX, reguladoras do cálcio no coração. Test T de Student não pareado. * = Diferença significativa SERCA/PLB ($p=0,004$), SERCA/NCX ($p=0,023$). Média $\pm$ Desvio padrão. Animais/grupo: 8 Controle, 10 Câncer.

6. DISCUSSÃO

Os principais resultados do presente estudo são que camundongos inoculados com células de *Lewis Lung Carcinoma* apresentam: 1) aumento no peso do baço, fígado e pulmão; 2) diminuição na capacidade física; 3) diminuição na fração de ejeção do ventrículo esquerdo; 4) diminuição no transiente de cálcio do cardiomiócito e 5) alterações na expressão de proteínas envolvidas nas vias de cálcio do cardiomiócito.

6.1 Alteração em Órgãos

O baço é um órgão que tem um papel fundamental, tanto na função imunológica inata, quanto na produção, regulação e armazenamento das células do sangue.⁷³ Sua ação é crucial na proteção contra patógenos transmitidos pela corrente sanguínea. Além de operar como um filtro removendo células sanguíneas danificadas, esse órgão armazena células e produz leucócitos.⁷³ O baço pode ser afetado por diversas neoplasias, tais como, linfoma, angiossarcoma e metástase originada em outros órgãos devido ao câncer, entre eles o melanoma, mama e pulmão. Dados apontam também o linfoma não-Hodgkin como aquele que mais acomete o baço.⁷⁴

O aumento no baço de camundongos inoculados com células de *Lewis Lung Carcinoma* no nosso estudo confirma o de outros estudos nos quais foi verificado aumento do baço por um aumento de granulócitos onde essa granulocitose não ocorre apenas pelo recrutamento de granulócitos do sangue periférico, mas também, pelo desenvolvimento e/ou diferenciação de granulócitos da medula óssea.⁷⁵ Na tentativa de ampliar o conhecimento nessa área, um estudo recente do nosso grupo mostrou que o treinamento físico é uma terapia não farmacológica eficaz na atenuação do crescimento tumoral e da esplenomegalia induzida pelo câncer.⁷⁶ Nesse estudo observou-se também uma diminuição nos níveis de mRNA do fator plaquetário 4, isto é, um gene associado à esplenomegalia durante a progressão tumoral.

Num estudo recente e pioneiro foi demonstrado que o câncer de pulmão leva a um aumento significativo no peso do fígado, acompanhado de fibrose ao longo da evolução do câncer.⁷⁷ Nossos resultados corroboram esses achados. Nós verificamos um aumento significativo no peso do fígado em camundongos inoculados com células de *Lewis Lung Carcinoma*. A explicação para esse aumento do fígado está fora do

escopo do nosso estudo. Contudo, alguém poderia suspeitar que essa resposta se deve à metástase desenvolvida ao longo da evolução da doença. Sabe-se que o fígado é um local comum de concentração de células cancerígenas no câncer de pulmão, cujo resultado é a hepatomegalia.⁷⁸

No presente estudo, nós verificamos um aumento significativo no peso do pulmão. Esse achado reproduz os de outros estudos.⁷⁹ O aumento no peso desse órgão está diretamente correlacionado ao crescimento da massa tumoral, o que é considerado uma medida direta e precisa da progressão da doença.⁷⁹ Embora não tenhamos realizado análises para verificar a presença de metástase, o dado de peso do pulmão serve como uma estimativa de progressão da doença.⁷⁹

6.2 Diminuição na Capacidade de Exercício

O teste de exercício progressivo máximo em esteira rolante tem sido rotineiramente empregado para avaliar a capacidade física, em diferentes condições patológicas, tanto em animais,⁸⁰ quanto em humanos.⁸¹ Em nosso estudo, camundongos transplantados com células de *Lewis* apresentaram redução na distância percorrida, velocidade de corrida e tempo de corrida no teste de exercício em esteira rolante. Essas respostas evidenciam uma diminuição na capacidade de exercício. Alteração na resposta ao exercício físico no câncer de pulmão foi também verificada por outros autores. Eles observaram que camundongos inoculados com células de *Lewis* apresentavam redução de 30% na atividade física espontânea em roda giratória disponível na gaiola.⁸²

O que não se conhece são os mecanismos envolvidos na intolerância ao exercício no câncer de pulmão. Esse ponto, complexo e de difícil explicação, não é esclarecido no presente estudo. No entanto, é possível levantar algumas hipóteses para explicar tal resposta fisiológica. Uma delas seria uma diminuição na função cardíaca e, consequentemente, do débito cardíaco durante o exercício. A redução na fração de ejeção do ventrículo esquerdo nos camundongos com câncer corrobora essa ideia. Sabe-se que o suprimento de oxigênio para a musculatura esquelética durante o exercício físico progressivo máximo depende muito do aumento no débito cardíaco.⁸³ Portanto, uma elevação prejudicada do débito cardíaco durante o exercício físico pode contribuir para uma menor capacidade de exercício em camundongos com câncer de pulmão. O débito cardíaco durante o exercício não foi avaliado no presente estudo.

Contudo, a ideia de um débito cardíaco insuficiente durante o exercício encontra amparo nos conhecimentos advindos da insuficiência cardíaca. É bem conhecido que pacientes com insuficiência cardíaca com fração de ejeção do ventrículo esquerdo diminuída apresentam um aumento limitado do débito cardíaco durante o exercício progressivo máximo e que essa resposta explica, em grande parte, a intolerância ao exercício nesses pacientes.⁸⁴ Resposta semelhante poderia explicar a intolerância ao exercício no câncer de pulmão.

Claro, nós não podemos afastar a hipótese de que alterações na musculatura esquelética também têm um papel importante na intolerância ao exercício no câncer de pulmão. Há evidências de que esse tipo de câncer provoca caquexia.^{85,86} A perda acentuada de massa muscular pode causar uma profunda alteração na capacidade de exercício. De fato, estudo prévio mostra uma forte correlação entre o consumo de oxigênio de pico e a função muscular do quadríceps em pacientes com câncer de pulmão.⁸⁷ Portanto, é legítimo propor que a perda de massa muscular pode ter tido um impacto muito relevante na tolerância ao exercício no presente estudo.

Na tentativa de esclarecer as alterações na musculatura esquelética provocada pelo câncer de pulmão, alguns autores identificaram mircoRNAs que são expressos no músculo esquelético em pacientes com câncer.⁸⁸ Essas informações moleculares têm potencial para nortear explicações para a intolerância ao exercício no câncer de pulmão. Com outras abordagens moleculares, alguns autores levantaram a hipótese de que a miostatina que regula negativamente o crescimento muscular pode estar envolvida na “miopatia esquelética” e, em consequência, na intolerância ao exercício no câncer de pulmão. Apesar dessa hipótese ser, no mínimo, logicamente pertinente, ela não foi confirmada. O bloqueio da miostatina em camundongos inoculados com células de *Lewis* não alterou a capacidade de exercício, o que sugere que essa proteína não tem um papel importante na intolerância ao esforço no câncer de pulmão e que outros mecanismos musculares podem esclarecer melhor essa resposta.⁸⁹

Outros estudos, com o objetivo de mitigar ou mesmo melhorar a capacidade de exercício na presença do câncer de pulmão, mostraram que a intolerância ao exercício provocada pela inoculação subcutânea de *Lewis Lung Carcinoma* em camundongos é prevenida pelo treinamento físico intervalado de alta intensidade. Uma resposta que pode estar relacionada ao retardo no crescimento tumoral.⁹⁰ Em outro estudo, foi demonstrado que o treinamento aeróbio e o treinamento combinado (aeróbio+resistido) são mais efetivos na melhora da capacidade cardiorrespiratória

que o treinamento resistido isolado.⁹¹ Esses estudos são de grande relevância no tratamento do câncer de pulmão. A busca por novas estratégias de tratamento deve ser objeto de futuras investigações numa área em que, apesar dos esforços e avanços, o prognóstico de sobrevivência é pouco animador.

6.3 Alterações na Função Cardíaca e na Estrutura de Cardiomiócito

A avaliação da morfologia e da função cardíaca através da ecocardiografia tem sido uma conduta de muita frequente na prática clínica.⁹² No presente estudo, nós nos valemos dessa técnica para avaliar a morfologia e a função cardíaca em camundongos com câncer de pulmão. Nós verificamos que camundongos transplantados com células de *Lewis Lung Carcinoma* apresentam diminuição na fração de ejeção do ventrículo esquerdo. Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores. Eles verificaram que camundongos com câncer de pulmão apresentavam redução na fração de ejeção e aumento no diâmetro interno do ventrículo esquerdo, tanto na fase sistólica quanto na fase diastólica, ambos indicativos de dilatação ventricular.³⁸ Em outro tipo de câncer, nós descrevemos que o desenvolvimento do câncer de mama em camundongas MMTV-PyMT+ provoca diminuição no *strain* e *strain rate* longitudinal na análise de *speckle-tracking*.⁴¹

Além da redução na fração de ejeção, o nosso estudo mostra que camundongos com câncer de pulmão apresentam uma forte tendência de redução do septo interventricular ($p=0,052$). Alteração na estrutura cardíaca também foi observada em câncer de mama. Camundongas MMTV-PyMT+ têm massa do ventrículo esquerdo diminuída quando comparadas com suas irmãs camundongas MMTV-PyM-. Outros verificaram que animais com câncer de fígado apresentam perda progressiva de massa cardíaca, acompanhada de fibrose e apoptose e deterioração da função ventricular esquerda, o que parece estar associado a um estado crônico de inflamação tecidual, estresse oxidativo e ativação neuro-hormonal.⁹³ Além disso, outros autores apontam para o fato de que o câncer de *Lewis* induz um estado pró-inflamatório sistêmico, o que leva a uma redução significativa na inervação miocárdica e a um fenótipo catabólico de cardiomiócitos.⁹⁴

No nosso estudo, a análise quantitativa morfométrica do músculo cardíaco mostra uma forte tendência a aumento na área de fração de colágeno nos camundongos transplantados com células de *Lewis Lung Carcinoma* (0,062), o que é condizente com

um aumento na área de fibrose ventricular nesses camundongos. Esses achados são concordantes com aqueles encontrados num estudo recente no qual autópsias de pacientes que foram a óbito antes do tratamento mostraram uma redução significativa do septo interventricular e a presença de fibrose.⁹⁵ Da mesma forma, utilizando a ressonância magnética cardíaca, um método não invasivo de alta precisão, alguns pesquisadores identificaram alterações no tecido miocárdico e na função cardíaca em pacientes com câncer.⁹⁶

6.4 Alterações Moleculares Relacionadas às Vias de Cálcio

O cálcio é um elemento químico fundamental no processo de contração e relaxamento do músculo cardíaco.⁹⁷ A movimentação do cálcio no cardiomiócito durante o ciclo cardíaco depende da atividade de muitas proteínas.⁹⁸ Assim, a determinação da expressão de proteínas relacionadas às vias de cálcio no cardiomiócito é de muita importância na avaliação da função cardíaca. Tão relevante quanto a expressão de proteínas é o estudo do movimento de cálcio no cardiomiócito. No presente estudo, com o objetivo de compreender as alterações na função cardíaca provocadas pelo câncer de pulmão, nós estudamos a expressão de proteínas relacionadas às vias de cálcio e o transiente de cálcio no cardiomiócito de camundongos inoculados com células de *Lewis Lung Carcinoma*. Nós verificamos, pela primeira vez, que o câncer de pulmão causa alterações significativas nas vias de cálcio do cardiomiócito. Ele aumenta a expressão proteica de PLB. Esse é um achado importante porque essa proteína ao se combinar com a SERCA2a num complexo mecanismo regulatório heterodimérico 1:1 resulta em inibição da SERCA2a. Essa resposta inibitória da SERCA2a pode levar a uma redução na recaptção de cálcio para o retículo sarcoplasmático com consequência na função cardíaca. Há evidência de que alteração na razão SERCA2a/PLB influencia a contratilidade miocárdica e tem um papel importante na deterioração função cardíaca comumente observada na insuficiência cardíaca.^{99,100}

O nosso estudo mostra que camundongos com câncer de pulmão apresentam profunda alteração no fluxo de cálcio no cardiomiócito. Os níveis basais de cálcio, velocidade de liberação de cálcio, amplitude do sinal de cálcio, velocidade de recaptção de cálcio e níveis de cálcio estão significativamente diminuídos nos camundongos inoculados com células de *Lewis Lung Carcinoma*. As alterações no transiente de cálcio e na expressão de proteínas das vias de cálcio parecem explicar,

pelo menos em parte, a diminuição na fração de ejeção do ventrículo esquerdo no presente estudo em modelo experimental de câncer de pulmão. Alteração na função cardíaca e nos mecanismos moleculares associados têm sido documentados também em outros tipos de câncer. Em estudo do nosso grupo em camundongos MMTV-PyMT+ portadores do câncer de mama mostra diminuição no *strain* longitudinal e no *strain rate* longitudinal associados ao aumento na expressão de PLB e diminuição na razão SERCA2a/PLB.⁴¹ Outros autores, estudando a função cardíaca em modelo murino de caquexia induzida por adenocarcinoma de cólon-26, observaram que o coração isolado apresenta um déficit acentuado na contração e no relaxamento, tanto em condições basais quanto durante estimulação.¹⁰¹ De maneira complementar, estudo em miócitos cardíacos demonstrou uma diminuição significativa na taxa de pico de contração e relaxamento do cardiomiócito. Essas alterações foram acompanhadas por redução nas taxas de pico e decaimento de cálcio, o que indica um comprometimento nos mecanismos de manuseio do cálcio intracelular.¹⁰¹

Outra observação molecular de interesse no presente estudo está relacionada ao NCX. Surpreendentemente, a expressão dessa proteína estava aumentada nos camundongos com câncer de pulmão. Nós não temos uma explicação para essa resposta. Mas, alguém poderia levantar a hipótese de que o aumento na expressão do NCX se deve a um mecanismo compensatório às anormalidades em outras vias de cálcio. Um aumento no conteúdo citoplasmático de cálcio devido a uma menor recaptação sarcoplasmática pela inibição da SERCA2a seria compensada pela maior atividade do NCX. A menor razão SERCA2a/NCX nos camundongos com câncer fortalece essa ideia. Outros associam o aumento da expressão do NCX à condição de estresse celular.¹⁰² O aumento na expressão do NCX tem sido verificado também em outras patologias. Camundongos com insuficiência cardíaca causada por hiperatividade simpática desenvolvida pela falta de ambos 2A/2C-adrenoceptores apresentam aumento na expressão do NCX.¹⁰³ Interessante nesse estudo foi o fato de que o treinamento físico diminuiu a expressão do NCX para níveis normais, o que foi acompanhado de um aumento na expressão de SERCA2 para níveis normais.

6.5 Limitações

Nós reconhecemos limitações em nosso estudo. Em conformidade com as diretrizes de cuidado animal, os camundongos foram eutanasiados ao atingir o volume tumoral de 1 cm³. Essa conduta impossibilitou a avaliação do câncer de pulmão em estágios mais avançados. O modelo de implantação de células heterotópico para o desenvolvimento do câncer de pulmão pode limitar a generalização dos nossos achados para modelos ortotópicos ou modelos de câncer genético. O débito cardíaco não foi avaliado no presente estudo. Apenas a avaliação da fração de ejeção do ventrículo esquerdo está disponível. Da mesma forma, nós não temos informações sobre possíveis alterações na musculatura esquelética. Portanto, nós não sabemos se a diminuição na capacidade física em camundongos com câncer de pulmão se deve a alterações centrais ou periféricas.

6.6 Perspectivas

O câncer é uma das doenças que mais contribui para a mortalidade entre todas as doenças. A sua associação com a doença cardiovascular torna o câncer uma doença ainda mais desafiadora. Portanto, estudos envolvendo ambas as doenças são de enorme importância para a área de saúde. No presente estudo, nós investigamos se o desenvolvimento do câncer de pulmão pode provocar alterações cardíacas. A diminuição na fração de ejeção do ventrículo esquerdo e as alterações nas vias de cálcio no cardiomiócito em camundongos inoculados com células de *Lewis Lung Carcinoma* evidenciam que o câncer de pulmão per se pode provocar profundas alterações na função cardíaca e nos seus mecanismos de regulação. Além disso, esses resultados confirmam a nossa hipótese de que o câncer de pulmão favorece o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. A intolerância ao exercício na presença do câncer de pulmão é uma observação muito importante em nosso estudo. Está bem documentado que a redução na capacidade física se associa com a mortalidade, independentemente da presença de doenças.¹⁰⁴ Finalmente, os nossos resultados projetam reflexões para estudos clínicos. Eles ressaltam a importância do acompanhamento clínico e dos cuidados com o paciente com câncer de pulmão durante o tratamento oncológico.

7. Conclusões

O câncer de pulmão pode causar alteração na função sistólica do ventrículo esquerdo. Essa resposta parece ser explicada, pelo menos em parte, pelas alterações na expressão de proteínas das vias de cálcio e no transiente de cálcio do cardiomiócito. Além dessas alterações, o câncer de pulmão provoca profunda diminuição na capacidade de exercício, o que pode estar associada à disfunção ventricular.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
2. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. 4. ed. rev. atual. Rio de Janeiro: INCA; 2018.
3. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;140(6):883-99.
4. Prates C, Sousa S, Oliveira C, Ikram S. Prostate metastatic bone cancer in an Egyptian Ptolemaic mummy, a proposed radiological diagnosis. *Int J Paleopathol*. 2011;1(2):98-103.
5. Chene G, Lamblin G, Le Bail-Carval K, Beaufile E, Chabert P, Gaucherand P, et al. Le(s) cancer(s) de Lucy: une origine préhistorique? *Gynecol Obstet Fertil*. 2016;44(12):690-700. French.
6. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, et al. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2024. Acessado em: <https://gco.iarc.who.int/today>
7. Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2022.
8. World Health Organization. Global Health Estimates 2020: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2019. Geneva: WHO; 2020. Acessado em: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death>
9. Bray F, Laversanne M, Weiderpass E, Soerjomataram I. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer*. 2021 Aug 15;127(16):3029–30.
10. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-49.
11. Nooreldeen R, Bach H. Current and future development in lung cancer diagnosis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(16):8661.
12. Allemani C, Weir HK, Carreira H, Harewood R, Spika D, Wang XS, et al. Global surveillance of cancer survival 1995-2009: analysis of individual data for 25,676,887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *Lancet*. 2015;385(9972):977-1010.
13. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2019. Atlanta: American

Cancer Society. 2019.

14. Schabath MB, Cote ML. Cancer progress and priorities: lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2019;28(10):1563-79.
15. Donington JS, Colson YL. Sex and gender differences in non-small cell lung cancer. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 2011;23(2):137-45.
16. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*. 2019;69(1):7-34.
17. Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1999 Jul 21;91(14):1194-210.
18. Hofmann JN, Church TR, Ramirez Y, et al. Non-smoking risk factors for lung cancer mortality in the US population. *Int J Cancer*. 2023 Feb 15;152(3):477-88.
19. Zhou W, Liu G, Hung RJ, Haycock PC, Aldrich MC, Andrew AS, et al. Causal relationships between body mass index, smoking and lung cancer: univariable and multivariable Mendelian randomization. *Int J Cancer*. 2021;148(5):1077-86.
20. Pope CA 3rd, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, et al. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA*. 2002;287(9):1132-41.
21. Brenner DR, Fehringer G, Zhang ZF, Lee YA, Meyers T, Matsuo K, et al. Alcohol consumption and lung cancer risk: a pooled analysis from the International Lung Cancer Consortium and the SYNERGY study. *Cancer Epidemiol*. 2019;58:25-32.
22. Matakidou A, Eisen T, Houlston RS. Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. *Br J Cancer*. 2005;93(7):825-33.
23. Schabath MB, Cote ML. Cancer progress and priorities: lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2019;28(10):1563-79.
24. Nooreldeen R, Bach H. Current and future development in lung cancer diagnosis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(16):8661.
25. Yan L, Sundaram S, Rust BM, Picklo MJ, Bukowski MR. Metabolomes of Lewis lung carcinoma metastases and normal lung tissue from mice fed different diets. *J Nutr Biochem*. 2022;107:109051.
26. Korde A, Jin L, Zhang JG, Ramaswamy A, Hu B, Kolahian S, et al. Lung endothelial microRNA-1 regulates tumor growth and angiogenesis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;196(11):1443-55.
27. Jiang ZB, Wang WJ, Xu C, Xie YJ, Wang XR, Zhang YZ, et al. Luteolin and its derivative apigenin suppress the inducible PD-L1 expression to improve anti-tumor immunity in KRAS-mutant lung cancer. *Cancer Lett*. 2021;515:36-48.

28. Kellar A, Egan C, Morris D. Preclinical murine models for lung cancer: clinical trial applications. *Biomed Res Int*. 2015;2015:621324.
29. Bugge TH, Kombrinck KW, Xiao Q, Holmbäck K, Daugherty CC, Witte DP, et al. Growth and dissemination of Lewis lung carcinoma in plasminogen-deficient mice. *Blood*. 1997;90(11):4522-31.
30. Bertram JS, Janik P. Establishment of a cloned line of Lewis lung carcinoma cells adapted to cell culture. *Cancer Lett*. 1980;11(1):63-73.
31. Boudoulas KD, Triposkiadis F, Gumina R, Addison D, Iliescu C, Boudoulas H. Cardiovascular disease, cancer, and multimorbidity interactions: clinical implications. *Cardiology*. 2022;147(2):196-206.
32. Desai A, Noor A, Joshi S, Kim AS. Takotsubo cardiomyopathy in cancer patients. *Cardio-oncology*. 2019;5:7.
33. Coma N, Moral S, Ballesteros E, Eraso A, Ventura M, Pujol E, Brugada R. Current Evidence on the Benefit of Exercise in Cancer Patients: Effects on Cardiovascular Mortality, Cardiotoxicity, and Quality of Life. *Rev Cardiovasc Med*. 2023 Jun 6;24(6):160
34. Brancaccio M, Pirozzi F, Hirsch E, Ghigo A. Mechanisms underlying the crosstalk between heart and cancer. *J Physiol*. 2020;598(14):3015-27.
35. Thackeray JT, Pietzsch S, Stapel B, Ricke-Hoch M, Lee CW, Bankstahl JP, et al. Insulin supplementation attenuates cancer-induced cardiomyopathy and slows tumor disease progression. *JCI Insight*. 2017;2(10):e93098.
36. Cospers PF, Leinwand LA. Cancer causes cardiac atrophy and autophagy in a sexually dimorphic manner. *Cancer Res*. 2011;71(5):1710-20.
37. Xu H, Crawford D, Hutchinson KR, Youtz DJ, Lucchesi PA, Velten M, et al. Myocardial dysfunction in an animal model of cancer cachexia. *Life Sci*. 2011;88(9-10):406-10.
38. Berent TE, Dorschner JM, Meyer T, Craig TA, Wang X, Kunz H, et al. Impaired cardiac performance, protein synthesis, and mitochondrial function in tumor-bearing mice. *PLoS One*. 2019;14(12):e0226440.
39. Mühlfeld C, Das SK, Heinzel FR, Schmidt A, Post H, Schauer S, et al. Cancer induces cardiomyocyte remodeling and hypoinnervation in the left ventricle of the mouse heart. *PLoS One*. 2011;6(5):e20424.
40. Tian M, Nishijima Y, Asp ML, Stout MB, Reiser PJ, Belury MA. Cardiac alterations in cancer-induced cachexia in mice. *Int J Oncol*. 2010;37(2):347-53.
41. da Costa TSR, Urias U, Negrao MV, Jordão CP, Passos CS, Gomes-Santos IL, et al. Breast cancer promotes cardiac dysfunction through deregulation of cardiomyocyte Ca²⁺-handling protein expression that is not reversed by exercise

- training. *J Am Heart Assoc.* 2021;10(5):e018076.
42. Cramer L, Hildebrandt B, Kung T, Wichmann K, Springer J, Doehner W, et al. Cardiovascular function and predictors of exercise capacity in patients with colorectal cancer. *J Am Coll Cardiol.* 2014;64(13):1310-9.
 43. Avraham S, Abu-Sharki S, Shofti R, Haas T, Korin B, Kalfon R, et al. Early cardiac remodeling promotes tumor growth and metastasis. *Circulation.* 2020;142(7):670-83.
 44. Hasin T, Gerber Y, McNallan SM, Weston SA, Kushwaha SS, Nelson TJ, et al. Patients with heart failure have an increased risk of incident cancer. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62(10):881-6.
 45. Banke A, Schou M, Videbaek L, Møller JE, Torp-Pedersen C, Gustafsson F, et al. Incidence of cancer in patients with chronic heart failure: a long-term follow-up study. *Eur J Heart Fail.* 2016;18(3):260-6.
 46. Meijers WC, Maglione M, Bakker SJL, Oberhuber R, Kieneker LM, de Jong S, et al. Heart failure stimulates tumor growth by circulating factors. *Circulation.* 2018;138(7):678-91.
 47. Herrmann J. Adverse cardiac effects of cancer therapies: cardiotoxicity and arrhythmia. *Nat Rev Cardiol.* 2020;17(8):474-502.
 48. Narayan HK, Finkelman B, French B, Plappert T, Hyman D, Smith AM, et al. Detailed echocardiographic phenotyping in breast cancer patients: associations with ejection fraction decline, recovery, and heart failure symptoms over 3 years of follow-up. *Circulation.* 2017;135(15):1397-412.
 49. Rodrigues AG, Sales ARK, Faria D, Fonseca SMR, Bond MMK, Jordão CP, et al. Sympathetic neural overdrive and diminished exercise capacity in reduced ejection fraction heart failure related to anthracycline-based chemotherapy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2023;325(5):H1126-32.
 50. Upadhyay S, Gupta KB, Mantha AK, Dhiman M. A short review: Doxorubicin and its effect on cardiac proteins. *J Cell Biochem.* 2021 Feb;122(2):153-65.
 51. Drafts BC, Twomley KM, D'Agostino R Jr, Lawrence J, Avis N, Ellis LR, et al. Low to moderate dose anthracycline-based chemotherapy is associated with early noninvasive imaging evidence of subclinical cardiovascular disease. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2013;6(8):877-85.
 52. Altomare C, Lodrini AM, Milano G, Biemmi V, Lazzarini E, Bolis S, Pernigoni N, et al. Structural and electrophysiological changes in a model of cardiotoxicity induced by anthracycline combined with trastuzumab. *Front Physiol.* 2021 Apr 7;12:658790.
 53. Sales ARK, Negrão MV, Testa L, Ferreira-Santos L, Groehs RVR, Carvalho B, et al. Chemotherapy acutely impairs neurovascular and hemodynamic responses in

- women with breast cancer. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2019 Jul 1;317(7):H1-H12.
54. Dent SF, Botros J, Rushton M, Aseyev O, Levine MN, Parulekar WR, O'Brien P, Burnell M, Pritchard KI, et al. Anthracycline-induced cardiotoxicity in patients with early-stage breast cancer: the Canadian Cancer Trials Group (CCTG) MA.21 experience. *Breast Cancer Res Treat*. 2020 Dec;184(3):733-41.
 55. Ozcan M, Guo Z, Valenzuela Ripoll C, Diab A, Picataggi A, Rawnsley D, Lotfinaghsh A, et al. Sustained alternate-day fasting potentiates doxorubicin cardiotoxicity. *Cell Metab*. 2023 Jun 6;35(6):928-42.
 56. Hequet O, Le QH, Moullet I, Pauli E, Salles G, Espinouse D, Dumontet C, et al. Subclinical late cardiomyopathy after doxorubicin therapy for lymphoma in adults. *J Clin Oncol*. 2004 May 15;22(10):1864-71.
 57. Lee CH, Zhang JF, Yuan KS, Wu ATH, Wu SY. Risk of cardiotoxicity induced by adjuvant anthracycline-based chemotherapy and radiotherapy in young and old Asian women with breast cancer. *Strahlenther Onkol*. 2019 Jul;195(7):629-39.
 58. Seidman A, Hudis C, Pierri MK, Shak S, Paton V, Ashby M, et al. Cardiac dysfunction in the trastuzumab clinical trials experience. *J Clin Oncol*. 2002 Mar 1;20(5):1215-21.
 59. Glen C, Morrow A, Roditi G, Hopkins T, Macpherson I, Stewart P, Petrie MC, Berry C, Epstein F, Lang NN, Mangion K. Cardiovascular sequelae of trastuzumab and anthracycline in long-term survivors of breast cancer. *Heart*. 2024 Apr 15;110(9):650-6.
 60. Liu Y, Chen C, Rong C, He X, Chen L. Anaplastic lymphoma kinase tyrosine kinase inhibitor-associated cardiotoxicity: a recent five-year pharmacovigilance study. *Front Pharmacol*. 2022 Mar 17;13:858279.
 61. Sapapsap B, Thongnoi P, Pongpun A, Kitcharoenpanya S, Todsarot T, Petchsomrit A, Leelakanok N. The prevalence of 5-fluorouracil and capecitabine cardiotoxicity: a systematic review and meta-analysis. *World J Oncol*. 2024 Dec;15(6):902-21.
 62. Abiodun AT, Ju C, Welch CA, Lai J, Tyrer F, Chambers P, et al. Fluoropyrimidine chemotherapy and the risk of death and cardiovascular events in patients with gastrointestinal cancer. *JACC CardioOncol*. 2025 Mar 28:S2666-0873(25)00089-4.
 63. Georgiopoulos G, Makris N, Laina A, Theodorakakou F, Briasoulis A, Trougakos IP, Dimopoulos MA, Kastiris E, Stamatelopoulos K. Cardiovascular toxicity of proteasome inhibitors: underlying mechanisms and management strategies. *JACC CardioOncol*. 2023 Feb 21;5(1):1-21.
 64. Lyon AR, Yousaf N, Battisti NML, Moslehi J, Larkin J. Immune checkpoint inhibitors and cardiovascular toxicity. *Lancet Oncol*. 2018 Sep;19(9):e447-58.

65. Piazza L, Carollo A, Di Martino E, Novara ME, Cutaia S, Provenzani A, Rizzo S. Cardiotoxicity associated with immune checkpoint inhibitors: systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2025 Feb;206:104587.
66. Nabati M, Janbabai G, Baghyari S, Esmaili K, Yazdani J. Cardioprotective effects of carvedilol in inhibiting doxorubicin-induced cardiotoxicity. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2017 May;69(5):279-85.
67. Langford DJ, Bailey AL, Chanda M, Clarke SE, Drummond TE, Echols S, et al. Facial expressions of pain in laboratory mice. *Nat Methods*. 2010;7(4):447-8.
68. Euhus DM, Hudd C, LaRegina MC, Johnson FE. Tumor measurement in the nude mouse. *J Surg Oncol*. 1986;31(4):229–34..
69. Tomayko MM, Reynolds CP. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1989;24(3):148–54.
70. Ferreira JCB, Campos JC, Qvit N, Qi X, Bozi LHM, Bechara LRG, et al. A selective inhibitor of mitofusin 1- β IIIPKC association improves heart failure outcome in rats. *Nat Commun*. 2019 Jan 18;10(1):329.
71. Gomes KM, Campos JC, Bechara LR, Queliconi B, Lima VM, Disatnik MH, et al. Aldehyde dehydrogenase 2 activation in heart failure restores mitochondrial function and improves ventricular function and remodelling. *Cardiovasc Res*. 2014 Sep 1;103(4):498-508.
72. Eckelman WC, Kilbourn MR, Joyal JL, Labiris R, Valliant JF. Justifying the number of animals for each experiment. *Nucl Med Biol*. 2007;34:229–232.
73. Crane GM, Liu YC, Chadburn A. Spleen: development, anatomy and reactive lymphoid proliferations. *Semin Diagn Pathol*. 2021 Mar;38(2):112-24.
74. Saboo SS, Krajewski KM, O'Regan KN, Giardino A, Brown JR, Ramaiya N, Jagannathan JP. Spleen in haematological malignancies: spectrum of imaging findings. *Br J Radiol*. 2012 Jan;85(1009):81-92.
75. Lee JK, Back TC, Komschlies KL, Ruscetti FW, Young HA, Wilttrout RH. Hematopoietic switch from lymphoid to granulocytic development in 3LL tumor-bearing mice. *In Vivo*. 2001 Jul-Aug;15(4):255-63.
76. Tobias GC, Gomes JLP, Fernandes LG, Voltarelli VA, de Almeida NR, Jannig PR, de Souza RWA, Negrão CE, Oliveira EM, Chammas R, Alves CRR, Brum PC. Aerobic exercise training mitigates tumor growth and cancer-induced splenomegaly through modulation of non-platelet platelet factor 4 expression. *Sci Rep*. 2023Dec 11;13(1):21970.
77. Rosa-Caldwell ME, Brown JL, Lee DE, Wiggs MP, Perry RA Jr, Haynie WS, Caldwell AR, Washington TA, Lo WJ, Greene NP. Hepatic alterations during the development and progression of cancer cachexia. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2020

May;45(5):500-12.

78. Yu P, Zhang L, Tian J, Liu J, Que Z, Li G, Zhou Y. NK cell depletion promotes liver metastasis of lung cancer cells. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2024 Feb 25;56(2):323-6.
79. Viswanath P, Peng S, Singh R, Kingsley C, Balter PA, Johnson FM. A novel method for quantifying total thoracic tumor burden in mice. *Neoplasia*. 2018 Oct;20(10):975-84.
80. Dong G, Ryan TE, Esser KA. Animal models of exercise and cardiometabolic disease. *Circ Res*. 2025 Jul 7;137(2):139-62.
81. Fletcher GF, Ades PA, Kligfield P, Arena R, Balady GJ, Bittner VA, Coke LA, Fleg JL, Forman DE, Gerber TC, Gulati M, Madan K, Rhodes J, Thompson PD, Williams MA; American Heart Association Exercise, Cardiac Rehabilitation, and Prevention Committee of the Council on Clinical Cardiology, Council on Nutrition, Physical Activity and Metabolism, Council on Cardiovascular and Stroke Nursing, and Council on Epidemiology and Prevention. Exercise standards for testing and training: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2013 Aug 20;128(8):873-934.
82. Counts BR, Halle JL, Carson JA. Early-onset physical inactivity and metabolic dysfunction in tumor-bearing mice is associated with accelerated cachexia. *Med Sci Sports Exerc*. 2022 Jan 1;54(1):77-88.
83. Ainab I, Van Ochten N, Suckow E, Pierce K, Arent C, Kay J, Forbes LM, Cornwell WK 3rd. Determinants of cardiac output in health and heart failure. *Exp Physiol*. 2025 May;110(5):637-48.
84. Rundqvist B, Eisenhofer G, Elam M, Friberg P. Attenuated cardiac sympathetic responsiveness during dynamic exercise in patients with heart failure. *Circulation*. 1997 Feb 18;95(4):940-5.
85. Al-Sawaf O, Weiss J, Skrzypski M, Lam JM, Karasaki T, Zambrana F, Kidd AC, Frankell AM, Watkins TBK, Martínez-Ruiz C, Puttick C, Black JRM, et al. Body composition and lung cancer-associated cachexia in TRACERx. *Nat Med*. 2023 Apr;29(4):846-58.
86. Snoke DB, Bellefleur E, Rehman HT, Carson JA, Poynter ME, Dittus KL, Toth MJ. Skeletal muscle adaptations in patients with lung cancer: longitudinal observations from the whole body to cellular level. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2023 Dec;14(6):2579-90.
87. Burtin C, Franssen FME, Vanfleteren LEGW, Groenen MTJ, Wouters EFM, Spruit MA. Lower-limb muscle function is a determinant of exercise tolerance after lung resection surgery in patients with lung cancer. *Respirology*. 2017 Aug;22(6):1185-9.
88. Van de Worp WRPH, Schols AMWJ, Dingemans AC, Op den Kamp CMH, Degens

- JHRJ, Kelders MCJM, et al. Identification of microRNAs in skeletal muscle associated with lung cancer cachexia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2020 Apr;11(2):452-63.
89. Busquets S, Toledo M, Orpí M, Massa D, Porta M, Capdevila E, Padilla N, Frailis V, López-Soriano FJ, Han HQ, Argilés JM. Myostatin blockage using actRIIB antagonism in mice bearing the Lewis lung carcinoma results in the improvement of muscle wasting and physical performance. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2012 Mar;3(1):37-43.
 90. Alves CRR, et al. High-intensity interval training slows down tumor progression in mice bearing Lewis lung carcinoma. *JCSM Rapid Commun*. 2018;1(2):1-10.
 91. Scott JM, Thomas SM, Herndon JE 2nd, Douglas PS, Yu AF, Rusch V, Huang J, Capaci C, Harrison JN, Stoeckel KJ, Nilsen T, Edvardsen E, Michalski MG, Eves ND, Jones LW. Effects and tolerability of exercise therapy modality on cardiorespiratory fitness in lung cancer: a randomized controlled trial. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2021 Dec;12(6):1456-65.
 92. Ogbemudia EJ, Sadoh WE. An assessment of the clinical utility of echocardiography criteria in a tertiary health center. *Niger Med J*. 2015 Jul-Aug;56(4):268-71.
 93. Springer J, Tschirner A, Haghikia A, von Haehling S, Lal H, Grzesiak A, et al. Prevention of liver cancer cachexia-induced cardiac wasting and heart failure. *Eur Heart J*. 2014 Apr;35(14):932-41.
 94. Mühlfeld C, Das SK, Heinzl FR, Schmidt A, Post H, Schauer S, Papadakis T, Kummer W, Hoefler G. Cancer induces cardiomyocyte remodeling and hypoinnervation in the left ventricle of the mouse heart. *PLoS One*. 2011;6(5):e20424.
 95. A A, Bolgan I, Coccato S, Saccà S, Laurino L, Azzarello G, Ausoni S. Cardiac wasting in head and neck cancer and in cardiac autopsies from different cancer types: a study in a chemo-naïve setting. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2023 Jun;14(3):1286-98.
 96. Labib D, Satriano A, Dykstra S, Hansen R, Mikami Y, Guzzardi DG, Slavikova Z, Feuchter P, Flewitt J, Rivest S, Sandomato R, Lydell CP, Howarth AG, Kolman L, Clarke B, Paterson DI, Oudit GY, Pituskin E, Cheung WY, Lee J, White JA. Effect of active cancer on the cardiac phenotype: a cardiac magnetic resonance imaging-based study of myocardial tissue health and deformation in patients with chemotherapy-naïve cancer. *J Am Heart Assoc*. 2021 May 4;10(9):e019811.
 97. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002 Jan 10;415(6868):198-205.
 98. Jafri MS. Models of excitation-contraction coupling in cardiac ventricular myocytes. *Methods Mol Biol*. 2012;910:309-35.

99. Cantilina T, Sagara Y, Inesi G, Jones LR. Comparative studies of cardiac and skeletal sarcoplasmic reticulum ATPases. *J Biol Chem*. 1993;268:17018–17025.
100. Sasaki T, Inui M, Kimura Y, Kuzuya T, Tada M. Molecular regulation of Ca^{2+} pump ATPase by phospholamban in cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 1992;267:1674–1679.
101. Law ML, Metzger JM. Cardiac myocyte intrinsic contractility and calcium handling deficits underlie heart organ dysfunction in murine cancer cachexia. *Sci Rep*. 2021 Dec 8;11(1):23627.
102. Pott C, Goldhaber JL. Na-Ca exchange in the regulation of cardiac excitation contraction coupling. *Cardiovasc Res*. 2005 Jul 1;67(1):198-206.
103. Rolim NP, Medeiros A, Rosa KT, Mattos KC, Irigoyen MC, Krieger EM, Krieger JE, Negrão CE, Brum PC. Exercise training improves the net balance of cardiac Ca^{2+} handling protein expression in heart failure. *Physiol Genomics*. 2007 May 11;29(3):246-52.
104. Blair SN, Kohl HW 3rd, Paffenbarger RS Jr, Clark DG, Cooper KH, Gibbons LW. Physical fitness and all-cause mortality. A prospective study of healthy men and women. *JAMA*. 1989 Nov 3;262(17):2395–401.