

**MAURO ROGÉRIO DE BARROS WANDERLEY JÚNIOR**

**Avaliação do valor preditivo dos biomarcadores  
mieloperoxidase e galectina-3 na detecção de  
cardiomiopatia secundária a quimioterápicos**

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

Programa de Cardiologia

Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Moreira Ayub  
Ferreira

**São Paulo**

**2021**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Wanderley Júnior, Mauro Rogério de Barros  
Avaliação do valor preditivo dos biomarcadores  
mieloperoxidase e galectina-3 na detecção de  
cardiomiopatia secundária a quimioterápicos / Mauro  
Rogério de Barros Wanderley Júnior. -- São Paulo,  
2021.  
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Cardiologia.  
Orientadora: Silvia Moreira Ayub Ferreira.

Descritores: 1.Cardiotoxicidade 2.Biomarcadores  
3.Mieloperoxidase 4.Galectina-3 5.Troponina  
6.Antagonistas adrenérgicos beta 7.Antraciclina

USP/FM/DBD-197/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

# Dedicatória

---

A minha amada esposa **Renata**, pelo amor, apoio, paciência e estímulo durante esta jornada.

A meu filho **Henrique**, pela sua existência e, simplesmente, por esta razão, estimular-me a ser uma pessoa melhor.

A minha mãe, **Maria Helena**, por ter me dado a direção e a vida.

A meu pai **Mauro** (*in memoriam*), por ter sido meu herói e minha inspiração.

A meu avô **Edgar** (*in memoriam*), pelo exemplo de dignidade e amor ao exercício da medicina.

A minha família, por todo o amor e ótimos momentos.

# Agradecimentos

---

A Deus, por me permitir completar este desafio com saúde.

A minha orientadora, Dra. Silvia Moreira Ayub Ferreira, pela oportunidade, competência e amizade.

Ao Prof. Dr. Edimar Alcides Bocchi, pelas aulas e ensinamentos.

Às enfermeiras Fátima das Dores Cruz e Sara Michelly Gonçalves Brandão, pela atuação e profissionalismo durante a pesquisa.

À funcionária da Unidade de Insuficiência Cardíaca, Maria de Lourdes Ribeiro, pela presteza e auxílio.

Aos médicos e pesquisadores da Unidade de Insuficiência Cardíaca, Dr. Paulo Roberto Chizzola, Dr. Victor Sarli Issa, Dr. Germano Emílio Conceição, Dra. Vera Salemi, pelos ensinamentos. Ao Prof. Dr. Guilherme Veiga Guimarães, pela amizade e conselhos.

Ao amigo Dr. Miguel Morita Fernandes da Silva, pela execução da estatística e auxílio no desenvolvimento do artigo. À Profa. Dra. Ludhmila Abrahão Hajjar, pelos ensinamentos e orientação na realização do artigo.

Aos companheiros de projeto, Mônica Samuel Ávila e Vagner Oliveira Carvalho Rigaud, pela competência e ajuda mútua, que fizeram com que o fardo ficasse mais leve.

A toda equipe do ICESP, que incentivou e apoiou a realização do projeto.

A todas as pacientes que, participaram da pesquisa.

À Fundação do Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão do auxílio à pesquisa e apoio financeiro a este projeto.

“It matter not how strait the gate,  
How changed with punishments the scroll,  
I am the master of my fate,  
I am the captain of my soul.”

Trecho de “Invictus” de William Ernest Henley

## Normatização adotada

---

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento de sua publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos e periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

# Sumário

---

Lista de Abreviaturas e Siglas .....	ix
Lista de Símbolos .....	xi
Lista de Figuras .....	xii
Lista de Tabelas.....	xiii
RESUMO .....	xiv
ABSTRACT .....	xvi
1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Monitorização da cardiotoxicidade .....	6
1.2 Métodos de imagem.....	10
1.3 Prevenção primária da cardiotoxicidade.....	12
1.4 Resultados do estudo CECCY.....	15
2 OBJETIVO.....	18
3 DESFECHOS E HIPÓTESE .....	20
3.1 Desfecho primário .....	21
3.2 Desfechos secundários .....	21
3.3 Hipótese .....	22
4 MÉTODOS .....	23
4.1 Desenho do estudo.....	24
4.2 População do estudo .....	28
4.3 Critérios de inclusão .....	29
4.4 Critérios de exclusão .....	29
4.5 Randomização, alocação e intervenção .....	29
4.6 Procedimentos do estudo .....	30
4.7 Análise estatística .....	38
5 RESULTADOS .....	41
5.1 Dados gerais .....	42
5.2 Desfecho primário.....	44
5.3 Desfechos secundários .....	45
6 DISCUSSÃO .....	51
7 CONCLUSÃO .....	71
8 ANEXOS .....	73
9 REFERÊNCIAS .....	92



# Listas

---

## ABREVIATURAS E SIGLAS

<b><sup>123</sup>I-mBG</b>	<sup>123</sup> I metaiodobenzilguanidina
<b>2D</b>	Bidimensional
<b>3D</b>	Tridimensional
<b>ANT</b>	Antraciclina
<b>β-bloqueador</b>	Betabloqueador
<b>BNP</b>	Peptídeo Natriurético Cerebral
<b>BRA</b>	Bloqueador do Receptor de Angiotensina
<b>CECCY</b>	<i><u>C</u>arvedilol <u>E</u>ffect in <u>P</u>reventing <u>C</u>hemotherapy <u>I</u>nduced <u>C</u>ardiotoxicit<u>Y</u></i>
<b>CF</b>	Classe Funcional
<b>CMQT</b>	Cardiomiopatia Dilatada Secundária a Quimioterápicos
<b>ColS</b>	Colaboradores
<b>CTX</b>	Cardiotoxicidade
<b>CVD</b>	Carvedilol
<b>DCV</b>	Doenças cardiovasculares
<b>DDVE</b>	Diâmetro Diastólico do Ventrículo Esquerdo
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>DOX</b>	Doxorrubicina
<b>DP</b>	Desvio Padrão
<b>DRZ</b>	Dexrazoxane
<b>DSVE</b>	Diâmetro Sistólico do Ventrículo Esquerdo
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>Eco TT</b>	Ecocardiograma Transtorácico
<b>Ex.</b>	Exemplo
<b>FAPESP</b>	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
<b>FEVE</b>	Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo
<b>Gal-3</b>	Galectina-3
<b>HAS</b>	Hipertensão Arterial Sistêmica
<b>HER2</b>	Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano

<b>HOCl</b>	Ácido hipocloroso
<b>IAM</b>	Infarto Agudo do Miocárdio
<b>ICFER</b>	Insuficiência Cardíaca com Fração de Ejeção Reduzida
<b>IC</b>	Insuficiência Cardíaca
<b>ICESP</b>	Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
<b>IECA</b>	Inibidor da Enzima Conversora da Angiotensina
<b>IMC</b>	Índice de Massa Corpórea
<b>InCor</b>	Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
<b>JACC</b>	Journal of the American College of Cardiology
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>Ln</b>	log natural
<b>MPO</b>	Mieloperoxidase
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Nitrito
<b>NT-ProBNP</b>	N-terminal do pró-hormônio do peptídeo natriurético do tipo B
<b>OVERCOME</b>	Enalapril and carvedilol for preventing chemotherapy-induced left ventricular systolic dysfunction in patients with malignant hemopathies
<b>PA</b>	Pressão Arterial
<b>PRADA</b>	<i>Prevention of Ca<sub>R</sub>diAc Dysfunction During Adjuvant Breast Cancer Therapy</i>
<b>QXT</b>	Quimioterapia
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>TnI</b>	Troponina I
<b>TnT</b>	Troponina T
<b>Top2<math>\alpha</math></b>	Topoisomerase 2 alfa
<b>Top2<math>\beta</math></b>	Topoisomerase 2 beta
<b>USP</b>	Universidade de São Paulo
<b>VD</b>	Ventrículo Direito
<b>VE</b>	Ventrículo Esquerdo
<b>VPN</b>	Valor Preditivo Negativo

## SÍMBOLOS

<b>%</b>	porcentagem
<b>&lt;</b>	menor que
<b>&gt;</b>	maior que
<b>≥</b>	maior ou igual a
<b>bpm</b>	batimentos por minuto
<b>mg</b>	miligrama
<b>mg/mL</b>	miligrama por mililitro
<b>min</b>	minuto
<b>mL</b>	mililitro
<b>mm</b>	milímetro
<b>mmHg</b>	milímetros de mercúrio
<b>ng/mL</b>	nanograma por mililitro
<b>pg/mL</b>	picograma por mililitro

## FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Medidas de TnI durante o tratamento quimioterápico.....	17
<b>Figura 2 -</b>	Desenho do estudo .....	27
<b>Figura 3 -</b>	Esquema ilustrativo do complexo microesfera, anticorpo de captura, biomarcadores Gal-3 e MPO, anticorpo de detecção e estreptavidina-ficoeritrina no ensaio Luminex®.....	33
<b>Figura 4 -</b>	Esquema ilustrativo das etapas de montagem à análise final dos dados obtidos no ensaio Luminex®. Níveis séricos basais de MPO em relação a TnI.....	35
<b>Figura 5 -</b>	Curvas dos biomarcadores Gal-3 e MPO do ensaio Luminex®.....	36
<b>Figura 6 -</b>	Critério de seleção e randomização .....	43
<b>Figura 7 -</b>	Gráficos e tabelas do kit Milliplex de MPO e Gal-3.....	46
<b>Figura 8 -</b>	Níveis séricos basais altos e baixos de MPO em relação a TnI .....	48
<b>Figura 9 -</b>	Pacientes com níveis séricos de MPO basal acima da média no grupo placebo e carvedilol e sua relação com níveis séricos de TnI .....	49
<b>Figura 10 -</b>	Pacientes com níveis séricos de MPO basal abaixo da média no grupo placebo e carvedilol e sua relação com níveis séricos de TnI .....	50
<b>Figura 11 -</b>	Estrutura química de Gal-3 .....	53
<b>Figura 12 -</b>	Estrutura molecular MPO .....	58
<b>Figura 13 -</b>	Sistema MPO.....	59
<b>Figura 14 -</b>	Fisiopatologia do modelo de cardiotoxicidade 1 .....	63
<b>Figura 15 -</b>	Fisiopatologia do modelo de cardiotoxicidade 2 .....	63

## TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Definições de cardiotoxicidade.....	4
<b>Tabela 2 -</b>	Métodos para detecção da cardiotoxicidade .....	11
<b>Tabela 3 -</b>	Protocolo padrão de quimioterapia no ICESP .....	28
<b>Tabela 4 -</b>	Parâmetros obtidos por ecocardiografia.....	38
<b>Tabela 5 -</b>	Queda da FEVE em relação ao comportamento dos biomarcadores .....	44
<b>Tabela 6 -</b>	Efeito do carvedilol nos níveis de Gal-3 e MPO .....	47

# Resumo

---

Wanderley Júnior MRB. *Avaliação do valor preditivo dos biomarcadores mieloperoxidase e galectina-3 na detecção de cardiomiopatia secundária a quimioterápicos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

**Introdução:** Antraciclina (ANT) frequentemente, é utilizada como quimioterápico para tratamento da neoplasia de mama, porém sua aplicação clínica é limitada pela cardiotoxicidade (CTX). CECCY trial (Carvedilol for Prevention of Chemotherapy-Related Cardiotoxicity) demonstrou que o betabloqueador carvedilol (CVD) pode reduzir a injúria miocárdica secundária à ANT. Mieloperoxidase (MPO) é um biomarcador de estresse oxidativo e Galectina-3 (Gal-3) é um biomarcador de fibrose e remodelamento cardíaco. Avaliou-se a correlação entre o comportamento da MPO e Gal-3 com CTX. **Métodos:** Foi realizada uma análise *post hoc* dos pacientes que participaram do CECCY trial. 192 mulheres tiveram amostras de sangue processadas e estocadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Após, as amostras foram analisadas em um único momento. Destas, 18 tiveram ao menos duas amostras hemolisadas e foram excluídas da pesquisa. As amostras de sangue foram obtidas na randomização e após 3 e 6 meses do início da quimioterapia (QT) com ANT. A dosagem de MPO e Gal-3 foi realizada pelo MILIPLEX MAP KIT (Merck Laboratories), com a utilização de tecnologia Luminex xMAP. **Resultados:** Durante o seguimento, 26 pacientes (14,9%) apresentaram queda  $\geq 10\%$  da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) em 6 meses após início da Qxt. Dentre estas, não houve diferença estatística no comportamento dos biomarcadores MPO e Gal-3 quando comparados com o grupo que não apresentou queda significativa de FEVE ( $p=0,85$  para Gal-3 e MPO). Níveis séricos de MPO [basal: 13,2 (7,9; 24,8), 3 meses: 17,7 (11,1; 31,1), 6 meses: 19,2 (11,1; 37,8) ng/mL] e Gal-3 [basal: 6,3 (5,2; 9,6), 3 meses: 12,3 (9,8; 16,0), 6 meses: 10,3 (8,2; 13,1) ng/mL] aumentaram após a QT com ANT, mas as alterações longitudinais foram similares entre o grupo placebo e CVD ( $p$  para interação: 0,28 e 0,32 respectivamente). Em uma análise exploratória, os valores de MPO e Gal-3 foram divididos em grupos acima e abaixo da média. No grupo placebo, mulheres com MPO sérica basal alta demonstraram um aumento maior na elevação de Tnl do que o grupo com MPO sérica abaixo da média ( $p=0,041$ ). Comparado ao placebo, CVD atenuou significativamente a elevação de Tnl em mulheres com MPO basal acima da média ( $p<0,001$ ) mas não atenuou a elevação de Tnl em mulheres com MPO sérica basal abaixo da média ( $p=0,97$ ;  $p$  para interação 0,009). Não houve diferença do comportamento da Tnl em relação aos níveis séricos basais de Gal-3 ( $p$  para interação = 0,99). **Conclusão:** Nesta subanálise do estudo CECCY, o comportamento dos biomarcadores MPO e Gal-3 não se correlacionou com

o desenvolvimento de CTX. Entretanto, níveis de MPO acima da média foram associados com maior injúria miocárdica e ajudaram a identificar mulheres mais propícias a se beneficiar de carvedilol, como prevenção primária (NCT01724450).

**Descritores:** Cardiotoxicidade; Biomarcadores; Mieloperoxidase; Galectina-3; Troponina; Antagonistas adrenérgicos beta; Antraciclinas.

# Abstract

---

Wanderley Júnio MRB. *Plasma biomarkers reflecting high oxidative stress predicts myocardial injury related to anthracycline chemotherapy: insights from the CECCY Trial* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

**Background:** Anthracycline (ANT) is often used as a chemotherapeutic drug for breast cancer treatment, but its clinical use is limited by cardiotoxic effects. CECCY trial demonstrated that the  $\beta$ -blocker carvedilol (CVD) could attenuate the myocardial injury secondary to ATN. Myeloperoxidase (MPO) is a biomarker of oxidative stress and galectin-3 (Gal-3) is a biomarker of fibrosis and cardiac remodeling. We evaluated the correlation between MPO and Gal-3 behavior with CTX and also the effects of CVD on MPO and Gal-3 blood levels. **Methods:** A *post hoc* analysis was performed in the patients who attended CECCY trial. 192 women had her blood samples stored during the study at - 80°C until the time of assay in a single batch. Stored blood samples were obtained at baseline, 3 and 6 months after the beginning of randomization. 18 women had at least two sample hemolyzed and were excluded. MPO and Gal-3 were measured using Luminex® xMAP® technology through MILLIPLEX® MAP KIT (Merck Laboratories). **Results:** 26 patients (14.9%) had a decrease of at least 10% in LVEF at 6 months after the initiation of chemotherapy. Among these, there was no significant difference in the MPO and Gal-3 when compared to the group without substantial drop in LVEF ( $p= 0.85$  for both MPO and Gal-3). Blood levels of MPO [baseline: 13.2 (7.9; 24.8), 3 months: 17.7(11,1; 31.1), 6 months: 19.2 (11.1; 37.8) ng/mL] and Gal-3 [baseline: 6.3 (5.2; 9.6), 3 months: 12.3 (9.8; 16.0), 6 months: 10.3 (8.2; 13.1) ng/mL] increased after ANT chemotherapy, and the longitudinal changes were similar between the placebo and CVD groups ( $p$  for interaction: 0.28 and 0.32, respectively). In an exploratory analysis, as there is no normal cutoff value established for Gal-3 and MPO in the literature, the MPO and Gal-3 results were splitted in two groups: above and below average. In the placebo group, women with high (above median) baseline MPO blood levels demonstrated a greater increase in TnI blood levels than those with low baseline MPO blood levels ( $p=0.041$ ). Compared with placebo, CVD significantly reduced TnI blood levels in women with high MPO blood levels ( $p<0.001$ ), but did not reduce the TnI levels in women with low baseline MPO blood levels ( $p=0.97$ ;  $p$  for interaction =0.009). There was no significant interaction between CVD treatment and baseline Gal-3 blood levels ( $p$  for interaction = 0.99). **Conclusion:** In this subanalysis of the CECCY trial, CVD did not affect changes in galectin-3 and MPO blood levels after ANT chemotherapy in women with breast cancer. Although these



biomarkers did not predict the development of CTX, high MPO blood levels was associated with worse myocardial injury and identified women who were most likely to benefit from carvedilol for primary prevention (NCT01724450).

**Descriptors:** Cardiotoxicity; Biomarkers; Myeloperoxidase; Galectin-3; Troponin; Adrenergic beta-antagonists; Anthracyclines.

# 1 Introdução

---

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares e as neoplasias são as principais causas de óbito no mundo <sup>(1)</sup>. Dentre as doenças cardiovasculares, as doenças cardíacas isquêmicas mantêm-se como a maior causa de morte <sup>(2)</sup>. Destaca-se também a insuficiência cardíaca (IC), associada com altos índices de admissão hospitalar e mortalidade. A taxa de mortalidade secundária à IC na população norte-americana, em 2014, foi de 96,9 mortes por 100.000 habitantes <sup>(3)</sup>. Em relação à hospitalização, a IC corresponde à maior causa na população sul americana <sup>(4)</sup>. No Brasil, 21% das admissões hospitalares secundárias a doenças circulatórias, em 2012, foram em decorrência de IC <sup>(5)</sup>. A mortalidade intra-hospitalar dos pacientes admitidos foi entre 3 e 4% nos norte-americanos <sup>(6)</sup> e 12,6% nos brasileiros <sup>(5)</sup>. Aproximadamente, 80% dos homens e 70% das mulheres com menos de 65 anos morrem dentro de 8 anos após o diagnóstico de IC <sup>(7)</sup>.

Em razão dos avanços no diagnóstico e tratamento, a mortalidade das neoplasias, em geral, apresentou decréscimo. A sobrevivência a longo prazo de pacientes com câncer tem a perspectiva de elevação de quase 30% na próxima década, com um número estimado de 18 milhões em 2022 só nos Estados Unidos da América <sup>(8)</sup>. Mulheres representam 49,5% da população mundial, porém compõem maioria na população acima de 60 anos, entre os quais o câncer ocorre de forma mais frequente. Entre as mulheres, câncer é a segunda causa de morte no mundo com um número estimado de 6,7 milhões de novos casos e 3,5 milhões de mortes no mundo em 2012. A

expectativa é de que aumente para 9,9 milhões de casos e 5,5 milhões de mortes anuais em 2030, como resultado do crescimento e envelhecimento da população. Mama, colorretal e pulmão são as neoplasias mais frequentes relacionadas à morte entre as mulheres. Dentre elas, câncer de mama é a mais frequente e a maior responsável por morte relacionada à neoplasia, com um número estimado de 1.7 milhões de casos (25% casos câncer) e 521.900 mortes em 2012 (15% das mortes relacionadas a neoplasia) <sup>(9)</sup>.

Apesar do avanço no tratamento das neoplasias, os efeitos adversos da quimioterapia podem levar a interrupção precoce do tratamento e prejudicar sua eficácia. Dentre os efeitos adversos cardiovasculares, destaca-se a cardiotoxicidade (CTX) <sup>(10)</sup>. Tipicamente, manifesta-se como cardiomiopatia dilatada durante o tratamento quimioterápico ou mais tardiamente <sup>(11-13)</sup>. Na população brasileira, a cardiomiopatia dilatada secundária a quimioterápicos (CMQT) representa 0,4% das etiologias de IC <sup>(5)</sup> e dados internacionais estimam prevalência de 1% <sup>(14)</sup>.

Cardiotoxicidade implica comprometimento da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE). Pode ser classificada em três tipos: aguda, que ocorre após uma dose de tratamento; precoce, em até um ano de tratamento e crônica, após o fim do tratamento quimioterápico. Cardinale e colaboradores demonstraram uma incidência de 9% de CTX durante 4 anos de seguimento em 2.625 pacientes que receberam tratamento quimioterápico que incluísse antraciclina (ANT), e a maioria ocorreu no primeiro ano (98%) <sup>(15)</sup>. Entretanto, existem diferentes classificações de CTX propostas, conforme descrito nos dados da Tabela 1.

**Tabela 1 -** Definições de cardiotoxicidade

Autor	Definição
<b>Alexander <i>et al.</i></b> <sup>(16, 17)</sup>	Leve: declínio de FEVE >10% Moderada: declínio na FEVE >15% para um valor absoluto de FEVE <45% Severa: insuficiência cardíaca (IC) sintomática
<b>Schwartz <i>et al.</i></b> <sup>(16, 18)</sup>	Declínio de FEVE >10% para um valor absoluto de FEVE <50%
<b>Cardiac Review and Evaluation Committee</b> <sup>(19)</sup>	Declínio de FEVE global ou mais severa no septo; Sinais e sintomas de IC; Declínio no FEVE ≥5% para um valor absoluto de FEVE <55% com sintomas de IC; declínio no FEVE ≥10% para um valor absoluto de FEVE <55%
<b>American Society of Echocardiography and European Association of Cardiovascular Imaging</b> <sup>(20)</sup>	Declínio de FEVE ≥10% para um valor absoluto de FEVE < 53%
<b>European Society of Cardiology</b> <sup>(21)</sup>	Declínio no FEVE ≥10% para um valor absoluto de FEVE <50%

Dentre os tratamentos quimioterápicos existentes, os que mais se associam à cardiotoxicidade são as antraciclinas, relacionadas à dose cumulativa <sup>(22, 23)</sup>. São utilizadas amplamente em tumores sólidos como câncer de mama e osteossarcoma, assim como em neoplasias hematológicas <sup>(24)</sup>.

As antraciclinas têm diversos mecanismos de ação para interferir com a replicação e com a rápida proliferação das células cancerígenas, induzindo apoptose nestas células. Entretanto, podem ao mesmo tempo induzir apoptose em células não cancerígenas <sup>(25-32)</sup>.

A ANT é o agente quimioterápico mais utilizado para o tratamento de câncer de mama <sup>(33)</sup>. Estudos prévios demonstravam incidência de disfunção

cardíaca em quase 50% dos pacientes <sup>(34)</sup>. No entanto, as doses cumulativas dos antracíclicos eram maiores, os métodos de detecção menos precisos e os critérios de definição da CTX mais heterogêneos. A incidência da CTX atual estimada com doses da ANT acumulada de até 400 mg/m<sup>2</sup> é entre 3-5%, até 550 mg/m<sup>2</sup> de 7-26% e com doses de 700 mg/m<sup>2</sup>, a incidência é entre 18-48% <sup>(35)</sup>. Além da dose cumulativa da ANT, outros fatores de risco para desenvolvimento de CTX são o sexo feminino, extremos de idade (<18 e >65 anos), insuficiência renal, radioterapia prévia ou concomitante envolvendo o coração, comorbidades como hipertensão arterial sistêmica, fatores genéticos e doenças cardíacas associadas ao aumento de stress na parede do ventrículo esquerdo, além do uso de outros quimioterápicos concomitantes como o trastuzumabe <sup>(35)</sup>.

A incidência da CTX apresentou decréscimo nas últimas décadas e estudos recentes demonstram incidência de 9% em 4 anos <sup>(15)</sup> e 13,5% durante 6 meses de seguimento <sup>(36)</sup>. Doses cumulativas menores contribuíram para este decréscimo, assim como detecção precoce por meio de monitoramento próximo de FEVE e instituição precoce de medidas terapêuticas para recuperação de FEVE <sup>(37)</sup>. A detecção precoce e o monitoramento de FEVE são fundamentais para o diagnóstico e início de medidas preventivas e terapêuticas.

## 1.1 MONITORIZAÇÃO DA CARDIOTOXICIDADE

A biópsia endomiocárdica é o padrão ouro para diagnóstico de cardiotoxicidade por antraciclina e existe um sistema de graduação de toxicidade, demonstrando que o dano miocárdico já ocorre com doses de 180 g/m<sup>2</sup> <sup>(38)</sup>. Por ser método invasivo, vem-se buscando outras formas de detecção de CTX.

A dosagem de biomarcadores é um método de fácil aplicação e não invasivo, que vem sendo estudado para detectar precocemente a CTX. A troponina I (TnI) é uma proteína exclusiva das células miocárdicas e está bem estabelecida como marcador de injúria miocárdica <sup>(39)</sup>. Cardinale e colaboradores demonstraram que, em 703 pacientes com neoplasias avançadas submetidos a altas doses de quimioterapia, a elevação precoce (logo após sessão de quimioterapia) e tardia (1 mês após sessão de quimioterapia) de TnI apresentou relação com injúria miocárdica. Quatrocentos e noventa e cinco pacientes não apresentaram elevação precoce nem tardia (grupo TnI<sup>-/-</sup>), 145 mostraram apenas elevação precoce (TnI<sup>+/-</sup>) e 63 apresentaram elevação precoce e tardia (TnI<sup>+/+</sup>). No primeiro grupo, não houve redução significativa de FEVE em 3 anos de seguimento. Em contrapartida, nos dois grupos com TnI positiva houve aumento significativo da disfunção ventricular esquerda <sup>(40)</sup>, demonstrando assim o alto valor preditivo negativo (VPN) da TnI. A elevação da TnI após um mês do tratamento quimioterápico foi relacionada à maior incidência de eventos cardíacos quando comparada a um aumento mais agudo e transitório <sup>(40)</sup>,

podendo sugerir uma lesão miocárdica mais persistente e significativa. Outros estudos foram realizados para avaliar a relação das TnI e CTX. Bosch e colaboradores realizaram estudo para avaliar a eficácia da prevenção primária com as medicações enalapril e carvedilol em 90 pacientes portadores de doenças hematológicas malignas. Não houve relação entre o comportamento dos níveis séricos da TnI e a disfunção ventricular pós-quimioterapia <sup>(41)</sup>. Gulati e colaboradores realizaram estudo 2x2 fatorial em 121 mulheres com câncer de mama em quimioterapia que incluísse a antraciclina epirrubicina em dose cumulativa de 240-400 mg/m<sup>2</sup>. Tratou-se de estudo placebo-controlado, duplo-cego e randomizado para receber succinato de metoprolol, candesartana e placebo. Houve elevação da TnI e TnT durante a quimioterapia e a elevação da mesma foi atenuada pelo succinato de metoprolol ( $p < 0,05$ ), mas não pelo candesartana. No entanto, não houve associação entre mudança no valor dos biomarcadores e mudança da FEVE <sup>(42)</sup>. Em nosso estudo CECCY trial, demonstramos elevação de TnI após quimioterapia com antraciclina em 200 mulheres com câncer de mama submetidas à prevenção primária com carvedilol. Trata-se de estudo duplo-cego, randomizado, placebo-controlado, em que houve elevação da TnI nos dois grupos, porém não houve relação entre a elevação de TnI e a disfunção ventricular. A magnitude da elevação de TnI foi significativamente menor no grupo que recebeu terapia com CVD <sup>(36)</sup>.

A troponina ultrasensível tem maior acurácia para evidenciar injúria miocárdica, é um preditor prognóstico independente em pacientes com IC,



porém existem poucos estudos que relacionem a troponina ultrasensível com cardiotoxicidade induzida por quimioterápicos <sup>(43, 44)</sup>.

Outro marcador cardíaco, o Peptídeo Natriurético Cerebral (BNP), é um hormônio secretado predominantemente nos ventrículos cardíacos que se apresenta em altos níveis em pacientes com insuficiência cardíaca (IC). É sintetizado em resposta à distensão da parede ventricular e à ativação neuro-hormonal. Além de marcador diagnóstico de IC, também é indicador de gravidade e prognóstico <sup>(45)</sup>. Alguns estudos utilizaram BNP como preditor de disfunção ventricular pós quimioterapia. O estudo OVERCOME (*Enalapril and carvedilol for preventing chemotherapy-induced left ventricular systolic dysfunction in patients with malignant hemopathies*) não encontrou relação entre o pico de BNP e mudança de FEVE <sup>(41)</sup>. No subestudo de avaliação de biomarcadores do PRADA (*Prevention of Cardiac Dysfunction During Adjuvant Breast Cancer Therapy*), houve aumento longitudinal dos biomarcadores BNP e NT-proBNP, porém não houve associação entre elevação destes biomarcadores e disfunção sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo <sup>(42)</sup>. Da mesma forma, no estudo CECCY (*Carvedilol for Prevention of Chemotherapy-Related Cardiotoxicity*) não houve correlação entre comportamento do BNP, após quimioterapia, e alteração da função ventricular <sup>(36)</sup>.

Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima derivada do leucócito, liberada por neutrófilos e monócitos ativados, produzidos secundariamente à resposta inflamatória e estresse oxidativo <sup>(46, 47)</sup>. Aumento nos níveis de MPO foram relatados em estudos prévios relacionados a eventos cardiovasculares

em pacientes com dor precordial <sup>(48)</sup>, assim como à presença de IC na população geral <sup>(49)</sup>. Em estudo de Ng e colaboradores, um papel potencial para aumentar a sensibilidade diagnóstica na população pesquisada para disfunção sistólica do ventrículo esquerdo (VE) entre população aparentemente saudável foi relatado, em associação com BNP, além de relação com a severidade da disfunção diastólica, disfunção de VD, e prognóstico em IC aguda <sup>(46, 50, 51)</sup>. Também foi demonstrada associação com mortalidade em pacientes com doença coronariana e relação com placas de ateroma instáveis <sup>(52, 53, 54)</sup>.

Estudos recentes correlacionam elevação dos níveis séricos de MPO com CTX. Ky e colaboradores descreveram uma melhora no valor preditivo da TnI para avaliar CTX quando adicionado ao aumento do nível sérico da MPO em mulheres com câncer de mama tratadas com doxorrubicina e trastuzumabe <sup>(55)</sup>. Durante o seguimento a longo prazo (15 meses) do mesmo estudo, MPO permaneceu como preditor de CTX <sup>(56)</sup>.

Galectina-3 (Gal-3) é uma proteína de 26 kDa, produzida por macrófagos e que estimula a fibrogênese, levando à proliferação fibroblástica e deposição de colágeno <sup>(57)</sup>. É constituída por uma  $\beta$ -galactosidase ligada à lecitina, envolvida na resposta inflamatória do coração insuficiente. Altos níveis séricos foram associados a remodelamento do VE e à mortalidade em diversos estudos <sup>(58, 59, 60)</sup>. Estudos demonstraram que Gal-3 foi preditor de mortalidade em IC aguda e crônica <sup>(61, 62, 63)</sup>. Gal-3, assim como a MPO, já foi testada para predizer CTX, com resultados conflitantes.

A maioria destes estudos não encontrou correlação entre seus níveis e desenvolvimento de CTX <sup>(42, 55, 56, 59)</sup>.

## **1.2 MÉTODOS DE IMAGEM**

A determinação da função ventricular pelos métodos de imagem antes do início da quimioterapia deve ser realizada <sup>(64)</sup>, seja com Eco TT com ou sem strain, ressonância nuclear magnética ou ventriculografia radioisotópica. Procura-se manter o mesmo método de avaliação durante o seguimento para monitorização de queda de FEVE em razão de variações inerentes à aplicação de diferentes métodos <sup>(21)</sup>, conforme os dados da Tabela 2.

**Tabela 2 -** Métodos para detecção da cardiotoxicidade

<b>Método</b>	<b>Critério diagnóstico atual</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Limitações</b>
Ecocardiograma; - Medida da FEVE em 3D - Medida da FEVE em 2D com método Simpson - <i>Strain</i> longitudinal global	- FEVE: queda de 10 pontos percentuais para um valor abaixo do limite inferior da normalidade - <i>Strain</i> longitudinal Global: redução >15% do valor basal	- Elevada disponibilidade - Não utilização de radiação - Avaliação hemodinâmica e de outras estruturas cardíacas	- Variabilidade entre observadores - Qualidade de imagem - <i>Strain</i> : variabilidade entre observadores e necessidade técnica
Ventriculografia radioisotópica	Queda >10 pontos percentuais na FEVE para um valor <50%	- Reprodutibilidade	- Exposição cumulativa de radiação - Limitada informação estrutural e funcional em outras estruturas cardíacas
Ressonância Nuclear Magnética	Sem uma definição universal. Utilizada para avaliar queda da FEVE sobretudo como confirmatória dos outros métodos	- Acurácia e reprodutibilidade - Detecção de fibrose miocárdica utilizando o MAPA T1 e avaliação da fração de volume extracelular	- Disponibilidade limitada - Adaptação do paciente
Biomarcadores cardíacos: - Troponina T - Troponina I Ultrassensível - BNP - NT-próBNP	Elevação dos marcadores	- Acurácia e reprodutibilidade - Elevada disponibilidade - Alta sensibilidade	- Evidência insuficiente para estabelecer significância nas elevações - Variações de diferentes kits - Papel da monitorização de rotina ainda não está bem estabelecido

FONTE: Adaptado de Zamorano *et al.* (21).

FEVE – fração de ejeção do ventrículo esquerdo; 3D – tridimensional; 2D – bidimensional; BNP – peptídeo natriurético cerebral; NT-proBNP - N-terminal do pró-hormônio do peptídeo natriurético do tipo B.

### 1.3 PREVENÇÃO PRIMÁRIA DA CARDIOTOXICIDADE

A identificação precoce dos pacientes com risco para CTX é o objetivo primário para cardiologistas e oncologistas. O melhor tratamento para cardiotoxicidade induzida por quimioterapia é a prevenção na primeira instância <sup>(65)</sup>. Atualmente, as abordagens recomendadas por diretriz na prevenção primária da cardiotoxicidade secundária às antraciclina são a redução do potencial cardiotoxígeno do quimioterápico pela limitação da dose cumulativa da medicação, administração com infusão contínua, utilização da forma lipossomal ou emprego de um derivado menos cardiotoxígeno da droga (epirrubina ou idarrubina) e o uso de fármacos cardioprotetores como dexrazoxane (DRZ) (agente quelante de ferro) <sup>(21)</sup>. Quando ocorre disfunção cardíaca pós quimioterapia, a função cardíaca recupera-se completamente em apenas 42% dos pacientes, apesar da ótima terapia farmacológica <sup>(37)</sup>.

Em relação ao uso de medicamentos para prevenção primária, os  $\beta$ -bloqueadores têm obtido resultados favoráveis na prevenção da cardiotoxicidade por doxorubicina desde sua aplicação em modelos animais. Com base nestes estudos, o efeito protetor não parece ser secundário a um efeito da classe dos  $\beta$ -bloqueadores e, supostamente, é baseado nas propriedades anti-oxidantes do carvedilol <sup>(66, 67)</sup>. Carvedilol (CVD) é um  $\beta$ -bloqueador não seletivo com propriedades  $\alpha$ -bloqueadoras. Age na função mitocondrial das células cardíacas e possui propriedades antioxidantes, o que pode melhorar a função cardíaca e a resistência à agressão. Este fármaco também foi utilizado como prevenção primária em

---

pequenos estudos em pacientes submetidos à quimioterapia com ANT, com alguns resultados favoráveis ao uso do betabloqueador <sup>(41, 68, 69, 70)</sup>.

Estudos com maior número de pacientes foram realizados na tentativa de consolidar o  $\beta$ -bloqueador como terapia de prevenção primária na cardiotoxicidade secundária a doxorrubicina. O estudo PRADA não demonstrou efeito do succinato de metoprolol sobre a prevenção no declínio de FEVE e, embora não tenha demonstrado prevenção de CTX, o grupo candesartana apresentou queda significativamente menor de FEVE comparado ao controle ( $p=0,026$ ) <sup>(71)</sup>. Tanto TnT como Tnl apresentaram maior elevação no grupo placebo comparado ao grupo succinato de metoprolol <sup>(42)</sup>. Posteriormente, o seguimento de 6 meses do estudo CECCY, que até o momento foi o maior estudo em prevenção primária de cardiotoxicidade secundária à doxorrubicina, demonstrou que poucos pacientes apresentaram redução precoce de FEVE (14,5% grupo carvedilol versus 13,5% grupo placebo;  $p=1,0$ ), porém o aumento nos níveis séricos de Tnl foi menor no grupo intervenção ( $p=0,003$ ) <sup>(36)</sup>. Em relação a outras drogas testadas para prevenção primária, Cardinale e colaboradores demonstraram benefício do inibidor da enzima conversora de angiotensina (IECA) enalapril como prevenção primária, somente naqueles pacientes que apresentaram alteração de troponina <sup>(72)</sup>. Demais estudos utilizando IECA <sup>(41)</sup> e bloqueadores do receptor de angiotensina (BRA) <sup>(71)</sup> não demonstraram a mesma relação.

Uma vez com disfunção ventricular, as terapêuticas para IC orientadas pelas diretrizes das Sociedades de Cardiologia são, muitas

vezes, extrapoladas aos pacientes com cardiomiopatia induzida por quimioterapia, mesmo que os dados de ensaios clínicos randomizados não estejam disponíveis, incluindo o uso de  $\beta$ -bloqueadores e IECA/BRA <sup>(73, 74)</sup>. Em estudos não randomizados de prevenção secundária de CTX com enalapril e carvedilol, a recuperação da fração de ejeção do ventrículo esquerdo foi reportada naqueles pacientes submetidos a tratamento precoce, logo após a apresentação clínica inicial de CTX <sup>(15, 37)</sup>.

Desta forma, a detecção precoce de cardiotoxicidade por meio do monitoramento frequente da função cardíaca, associado ao tratamento precoce, são fundamentais para a recuperação de FEVE. No entanto, a melhor estratégia seria prevenir a ocorrência da disfunção ventricular. Como explicitado anteriormente, o uso de fármacos, sobretudo o carvedilol, até o momento não foi superior ao placebo para prevenir cardiotoxicidade, apesar de reduzir a injúria miocárdica representada pela redução da elevação de TnI. No entanto, o impacto do  $\beta$ -bloqueador sobre a elevação da TnI não se correlacionou com a prevenção de disfunção ventricular nos últimos estudos <sup>(36, 42, 71)</sup>. Métodos mais sensíveis em prever cardiotoxicidade são necessários, já que, atualmente, aplicam-se doses menores de antraciclinas (quanto maior a dose cumulativa de ANT, maior o benefício do  $\beta$ -bloqueador <sup>(75)</sup>) associadas ao uso mais frequente de análogos menos cardiotoxícos, diminuindo a sua incidência

Na tentativa de avaliar métodos mais sensíveis para prever cardiotoxicidade, realizamos uma análise *post hoc* do estudo CECCY no qual tentamos, por meio da dosagem de MPO e Gal-3, aumentar a acurácia

da detecção precoce de CTX, para selecionar os pacientes que mais se beneficiariam da prevenção primária com CVD.

#### **1.4 RESULTADOS DO ESTUDO CECCY**

De abril de 2013 a janeiro de 2017, foram randomizadas 200 pacientes portadoras de câncer de mama e referidas à quimioterapia com ANT (doxorubicina) no Instituto do Câncer de São Paulo. Oito pacientes foram excluídos após a randomização. Consequentemente, 192 pacientes foram distribuídas aleatoriamente para receber carvedilol ou placebo para análise da intenção de tratar. As características basais das pacientes bem como as doses de carvedilol e placebo foram equilibradas entre os grupos ( $p=ns$ )<sup>(36)</sup>.

Durante o seguimento de 6 meses, 27 (14,0%) pacientes apresentaram diminuição de pelo menos 10% de FEVE. Destas, 14 (14,5%) estavam no grupo carvedilol e 13 (13,5%) no placebo ( $p=1,0$ ). Ao considerar a definição mais recente de cardiotoxicidade de 10 pontos percentuais e queda de FEVE abaixo do limite inferior de normalidade, apenas uma (1%) paciente no braço placebo (com queda de FEVE para 35%), e nenhuma no braço carvedilol preencheu os critérios de cardiotoxicidade<sup>(36)</sup>.

A FEVE basal média foi  $65,2 \pm 3,6\%$  no grupo placebo e  $64,8 \pm 4,7\%$  no carvedilol. Após 6 meses de quimioterapia, FEVE foi  $63,9 \pm 5,2\%$  no grupo placebo e  $63,9 \pm 3,8\%$  no carvedilol. Houve redução absoluta de



FEVE, não significante, de 1,3% no grupo placebo e 0,9% no grupo carvedilol em 6 meses ( $p=0,84$ ).

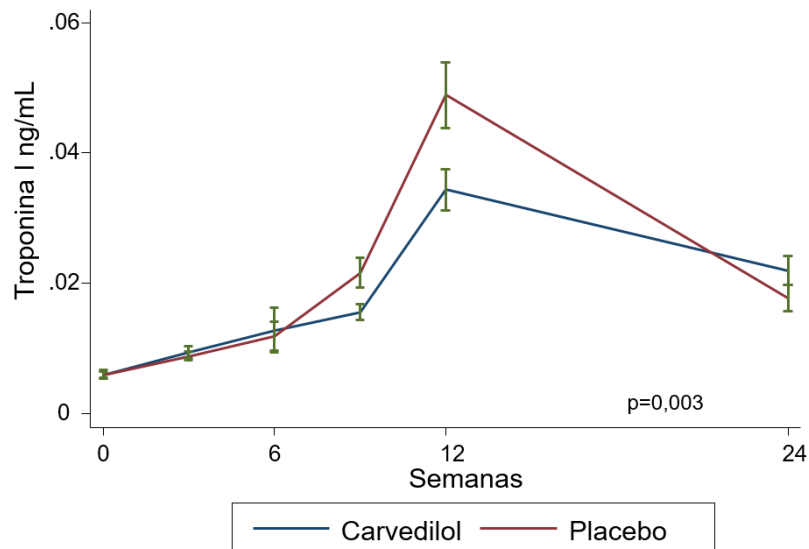
Em relação ao *status* de menopausa, nenhuma diferença foi evidenciada entre carvedilol e placebo nos subgrupos pré e pós-menopausa.

As medidas dos níveis de TnI foram realizadas após uma mediana de 19 dias de cada ciclo de doxorubicina. Os níveis de TnI, desde o início da quimioterapia até o final do estudo, elevaram-se em ambos os grupos. No entanto, esse aumento foi significativamente atenuado ( $p=0,003$ ) no braço carvedilol. Sessenta e cinco (33,8%) pacientes apresentaram níveis plasmáticos de TnI mais elevados do que 0,04 ng/mL. Destas, 25 (26,0%) estavam no grupo carvedilol e 40 (41,6%) no placebo ( $p=0,03$ ). Após o término dos ciclos de ANT houve queda nos níveis de TnI durante os ciclos de taxano (Figura 1). Para o BNP, no entanto, não houve diferença associada entre os grupos ( $p=0,85$ ).

Menor incidência de disfunção diastólica no grupo carvedilol foi encontrada, quando comparada ao placebo ( $p=0,039$ ). A incidência da disfunção diastólica no braço placebo aumentou progressivamente durante o tratamento com ANT, mas não no carvedilol. Na maioria (91%), o diagnóstico de disfunção diastólica apresentado foi classificado como disfunção diastólica grau I, ou seja, uma alteração de relaxamento.

Em relação aos desfechos clínicos, não houve diferenças significativas na incidência de eventos entre os grupos ao longo do seguimento. Durante o período de estudo, duas pacientes (2,1%) foram a

óbito no grupo carvedilol e duas (2,1%) no placebo ( $p=1,0$ ). Todas as mortes foram decorrentes da progressão da doença cancerígena <sup>(36)</sup>.



ng/mL – nanograma por mililitro

**Figura 1** - Medidas de troponina I durante o tratamento quimioterápico. O modelo estatístico foi o modelo linear misto no tempo como função quadrática

## **2 Objetivo**

---

## **2 OBJETIVO**

O objetivo do presente estudo foi avaliar o valor preditivo dos biomarcadores mieloperoxidase e galectina-3 relacionados à cardiotoxicidade secundária à antraciclina em mulheres portadoras de neoplasia de mama, participantes do estudo CECCY.

## **3 Desfechos e Hipótese**

---

### **3 DESFECHOS E HIPÓTESE**

#### **3.1 DESFECHO PRIMÁRIO**

- O desfecho primário do estudo foi avaliar a associação entre o aumento da concentração sérica dos biomarcadores mieloperoxidase e galectina-3 e a subsequente cardiotoxicidade, definida como queda na fração de ejeção do ventrículo esquerdo de, pelo menos, 10% do início da quimioterapia até seis 6 meses após o início do tratamento <sup>(17)</sup>, em pacientes com câncer de mama submetidos à quimioterapia com doxorrubicina, participantes do estudo CECCY.

#### **3.2 DESFECHOS SECUNDÁRIOS**

Os desfechos secundários incluíram:

- Avaliação do efeito do carvedilol no comportamento dos níveis séricos dos biomarcadores mieloperoxidase e galectina-3 e sua relação com as alterações nos níveis de troponina I, do início da quimioterapia até 6 meses após o começo do tratamento.
- Avaliação da alteração longitudinal dos níveis séricos dos biomarcadores mieloperoxidase e galectina-3.

### **3.3 HIPÓTESE**

Partiu-se da hipótese de que o aumento dos biomarcadores mieloperoxidase e galectina-3 poderiam prever a ocorrência de cardiotoxicidade pós-quimioterapia com antraciclina e aumentar a sensibilidade da troponina I ao prever este evento adverso.

## **4 Métodos**

---



## 4 MÉTODOS

O estudo "Avaliação do valor preditivo dos biomarcadores mieloperoxidase e galectina-3 na detecção de cardiomiopatia secundária a quimioterápicos" foi aprovado como subestudo do "Estudo duplo-cego randomizado e controlado sobre o efeito de betabloqueador na prevenção do desenvolvimento de cardiomiopatia secundária a quimioterápicos", pelo Comitê de Ética do Instituto do Coração (InCor) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAAE 35903412.9.1001.0068). Todos os participantes do estudo principal assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O mesmo estudo foi aprovado pela Comissão Científica e Coordenação de Pós-Graduação em Cardiologia (SDC 3571/10/160) e recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – 2010/18078-8), assim como foi registrado na base de estudos *CinicalTrials* (NCT01724450). O presente subestudo utilizou a verba excedente do estudo principal para a compra dos kits e realização da dosagem de mieloperoxidase e galectina-3.

### 4.1 DESENHO DO ESTUDO

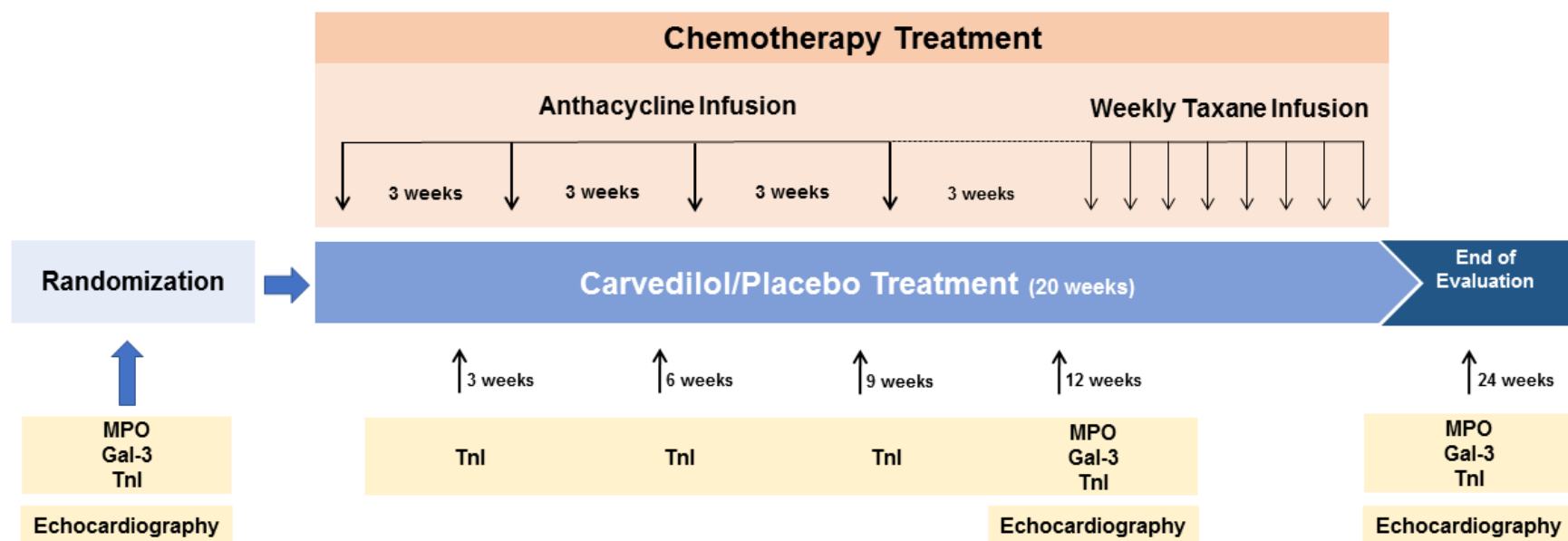
Uma análise *post hoc* foi realizada nos pacientes que participaram do estudo Carvedilol Effect in Preventing Chemotherapy Induced CardiotoxicitY

(CECCY) <sup>(36)</sup>. Resumidamente, trata-se de um estudo prospectivo, duplo-cego, randomizado, controlado por placebo, realizado na Unidade de Insuficiência Cardíaca do Instituto do Coração (InCor) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (São Paulo, Brasil) e no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP). As pacientes foram encaminhadas por meio do ICESP e avaliadas pela Equipe de Insuficiência Cardíaca do Instituto do Coração, responsável pela alocação, randomização, otimização da dose de carvedilol / placebo e seguimento das pacientes. Os dados foram coletados, gerenciados e analisados pela mesma equipe ao final do trabalho. O desenho do estudo foi aprovado pela comissão científica e comissão de ética de ambas as instituições. Todas as participantes foram informadas sobre os objetivos da pesquisa, seu protocolo e as alternativas de tratamento envolvidas, e assinaram o Termo de Consentimento Informado. O registro na base de dados ClinicalTrials.gov (NCT01724450) ocorreu antes do início do estudo.

As pacientes selecionadas para participar do estudo foram randomizadas para intervenção (carvedilol) ou placebo. Aquelas alocadas no grupo intervenção receberam carvedilol no início da quimioterapia, de maneira escalonada e progressiva a cada 3 semanas, iniciando com 3,125 mg duas vezes ao dia, que foi então aumentada para 6,25 mg duas vezes ao dia, depois para 12,5 mg duas vezes ao dia e, em seguida, para a dose máxima de 25 mg a cada 12 horas (50 mg/dia) ou até o aparecimento de sintomas ou FC <60 bpm, ou pressão arterial sistólica <110 mmHg, até completar 20 semanas de tratamento, sendo suspenso com o fim da

aplicação dos quimioterápicos (20 semanas). As pacientes alocadas no grupo placebo receberam a medicação de modo presumidamente escalonado e progressivo, de modo equivalente ao grupo intervenção. O placebo também foi mantido até completar o tratamento quimioterápico (20 semanas).

Os biomarcadores foram coletados após uma mediana de 19 dias de cada ciclo de quimioterapia com antraciclina. O acompanhamento da função ventricular foi realizado por meio da ecocardiografia seriada. Foram utilizadas amostras de sangue coletadas na randomização, após 12 e 24 semanas do início da quimioterapia (Figura 2), que haviam sido congeladas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  em freezer pertencente ao departamento de Insuficiência Cardíaca do Instituto do Coração (InCor). A realização da dosagem foi feita no Laboratório Central do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo em um único momento, após a conclusão e publicação do estudo CECCY.



mmHg – milímetros de mercúrio

**Figura 2 -** Desenho do estudo. Os biomarcadores foram coletados após os ciclos de antraciclina. As dosagens de mieloperoxidase e galectina-3 foram realizadas em amostras coletadas na randomização e após 3 e 6 meses do início da quimioterapia. Foi otimizada a dose de carvedilol/placebo a cada 3 semanas até o máximo de 50 mg/dia, ou aparecimento de sintomas, ou frequência cardíaca <60 batimentos por minuto, ou pressão arterial sistólica <110 mmHg. Carvedilol e placebo continuaram até o fim da quimioterapia (20 semanas)

## 4.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Trata-se de análise *post hoc* do estudo CECCY e, portanto, incluiu a mesma população. Foram abordadas consecutivamente todas as pacientes com câncer de mama e terapia que incluiu antraciclina (doxorrubicina), ciclofosfamida e taxano, de abril de 2013 até janeiro de 2017, atendidas no ICESP.

O protocolo padrão de quimioterapia compreendeu quatro ciclos de ciclofosfamida 600 mg/m<sup>2</sup> e doxorrubicina 60 mg/m<sup>2</sup> a cada 21 dias (dose total de 240 mg/m<sup>2</sup>), seguidos de paclitaxel 80 mg/m<sup>2</sup> semanalmente por 8 semanas, conforme os dados da Tabela 3.

**Tabela 3 -** Protocolo padrão de quimioterapia no ICESP

Regime	Ciclofosfamida	Doxorrubicina	Paclitaxel/Docetaxel
<b>AC→T</b>	600 mg/m <sup>2</sup> em 30 minutos a cada 21 dias	60 mg/m <sup>2</sup> em 30 minutos a cada 21 dias	Paclitaxel – 80 mg/m <sup>2</sup> em 2 horas/semana por 8 semanas

AC - antraciclina; T - taxano

Cento e noventa e duas mulheres participantes do estudo CECCY tiveram amostras coletadas durante o protocolo e congeladas a -80°C. Dezoito participantes que não tinham a amostra basal ou que as amostras sofreram hemólise, foram excluídas da análise. A análise dos biomarcadores

desta pesquisa foi realizada com o sangue estocado de 174 mulheres participantes do estudo original.

#### **4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

- Toda a população de mulheres participantes do estudo CECCY.

#### **4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**

- Participantes que tiveram a primeira amostra, antes do início da quimioterapia hemolisada.
- Participantes que não possuíam ao menos duas amostras íntegras, incluindo a primeira amostra.

#### **4.5 RANDOMIZAÇÃO, ALOCAÇÃO E INTERVENÇÃO**

A randomização do estudo principal ocorreu na proporção de 1:1 para receber carvedilol ou placebo e incluiu uma estratificação pré-especificada, de acordo com o estado da menopausa, considerando as potenciais diferenças de risco cardiovascular entre pacientes pré e pós-menopausa <sup>(76)</sup>. A randomização foi realizada por meio de uma lista baseada em programa

de computador. A sequência da randomização foi realizada em blocos de quatro, incluindo duas pacientes com carvedilol e duas com placebo. A ordem de carvedilol e placebo dentro de cada bloco foi atribuída aleatoriamente. Ambas, a randomização e a alocação das pacientes foram cegas para pacientes e pesquisadores. Os dados sobre randomização e alocação foram mantidos sob custódia da farmácia de pesquisa do ICESP, que era independente do estudo. Na presente análise *post hoc* não foi considerado o status pré e pós-menopausa. Após a dosagem dos biomarcadores, considerou-se apenas o grupo para os quais as pacientes haviam sido randomizadas (placebo ou carvedilol).

#### **4.6 PROCEDIMENTOS DO ESTUDO**

As pacientes elegíveis para o estudo CECCY foram submetidas a um Eco TT basal e testes laboratoriais de rotina que incluíram biomarcadores Tnl e BNP antes da randomização. Amostra adicional de sangue foi coletada e estocada em freezer a -80 °C para posterior dosagem de MPO e Gal-3. Cumpridos os critérios de elegibilidade, a randomização era realizada e a medicação iniciada.

As medidas sequenciais dos biomarcadores foram feitas após cada ciclo de doxorrubicina (basal, três, seis, nove, 12 e 24 semanas). O ecocardiograma foi realizado na metade do tratamento com doxorrubicina (6 semanas), após o término de doxorrubicina (12 semanas) e na avaliação

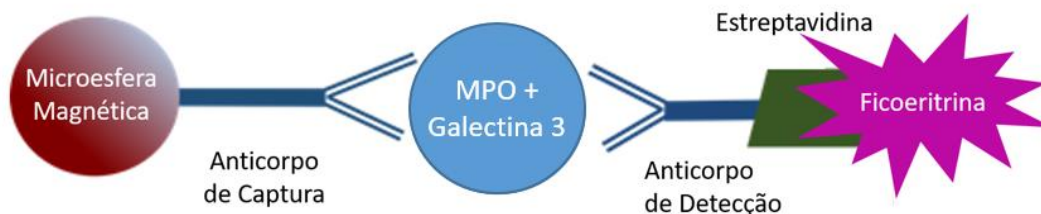
final (24 semanas). As dosagens de MPO e Gal-3 foram realizadas apenas em amostras coletadas e estocadas na randomização, 12 e 24 semanas após o início da quimioterapia. Sangue venoso foi coletado em tubo padrão para plasma com heparina e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), processados a 3100 rpm por 15 minutos, divididos em alíquotas e estocados a -80 °C até o momento da dosagem em um único lote. Para análise deste subestudo, só foram considerados os ecocardiogramas realizados na randomização, 12 e 24 semanas após o início da quimioterapia. Em virtude da ocorrência de hemólise em algumas amostras estocadas, utilizava-se a amostra imediatamente anterior; exemplo: se a amostra de 12 semanas estocada estivesse hemolisada, a análise de 9 semanas a substituía. Apenas a amostra basal teria que, obrigatoriamente, ser analisada. Se a mesma estivesse hemolisada, a paciente era excluída. Além disso, se não houvesse ao menos duas amostras íntegras para a análise, a paciente também era excluída. Os acompanhamentos com Eco TT, TnI, MPO e Gal-3 estão descritos nos dados da Figura 2.

A determinação quantitativa de TnI foi obtida por meio de imunoenensaio em sanduíche, em três etapas, usando tecnologia quimioluminescência direta e quantidades constantes de dois anticorpos monoclonais. Um reagente auxiliar foi incluído para reduzir a ligação não específica usando o *kit* comercial ADVIA Centaur® TnI-Ultra (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, EUA). O nível de detecção é de 0,006 ng/mL. Os níveis abaixo de 0,006 foram relatados como 0,005 ng/mL. O percentil 99% de TnI no estudo foi abaixo de 0,04 ng/ml.



A concentração plasmática de BNP foi obtida por meio de imunoenensaio em sanduíche de dois passos, utilizando tecnologia quimioluminescência direta e quantidades constantes de dois anticorpos monoclonais, usando o *kit* comercial ADVIA Centaur® (Siemens Medical Solutions Diagnostic, Los Angeles, EUA). Os resultados são apresentados em pg/mL. O nível de detecção é 2 pg/mL, sendo que os níveis abaixo deste valor foram relatados como 1 pg/mL. Para este subestudo do CECCY, não foram utilizados os valores de BNP para fins de comparação com os biomarcadores MPO e Gal-3 que estavam sendo testados, visto o BNP não ter apresentado associação com injúria miocárdica no estudo original.

MPO e Gal-3 foram dosados pela utilização do MILLIPLEX MAP KIT® (Merck Laboratories) com tecnologia Luminex® xMAP®. O ensaio pela tecnologia xMAP (*Multiple Analyte Profiling*) da Luminex®, ou ensaio Luminex® é um método multiplex que possibilita quantificar vários biomarcadores ao mesmo tempo, em uma pequena quantidade de plasma. A tecnologia xMAP da Luminex® possui o princípio similar ao ELISA sanduíche, porém utiliza microesferas coloridas fluorescentes (*beads*) que se ligam, de forma covalente, aos anticorpos de captura. Os anticorpos de captura são colocados diretamente contra o biomarcador desejado. Após uma série de lavagens, para remoção de proteínas não ligadas, anticorpos de detecção são adicionados para criar o complexo sanduíche, e posteriormente, a adição do conjugado estreptavidina-ficoeritrina, conforme os dados da Figura 3.



**Figura 3** - Esquema ilustrativo do complexo microesfera, anticorpo de captura, biomarcadores Gal-3 e MPO, anticorpo de detecção e estreptavidina-ficoeritrina no ensaio Luminex®

As amostras de plasmas foram coletadas em tubo contendo anticoagulante EDTA e foram centrifugadas a 1.000 g a 4 °C por 15 minutos, separando o plasma e o congelando a -80 °C. Para realização do ensaio, as amostras foram descongeladas e centrifugadas a 1.000 g, em temperatura ambiente por 10 minutos.

Para a dosagem dos biomarcadores Gal-3 e MPO, foi utilizado o kit Milliplex Map Human Circulating Cancer Biomarker Magnetic Bead Panel 3 (Millipore Corp., Billerica, MA, EUA).

Para reconstituição do padrão, diluição seriada para curva padrão, diluição de microesferas, amostras (foi realizada diluição 1:50 com tampão do kit), anticorpos, estreptavidina-ficoeritrina, solução de lavagem, seguimos as instruções da bula do kit, de acordo com o fabricante (Millipore).

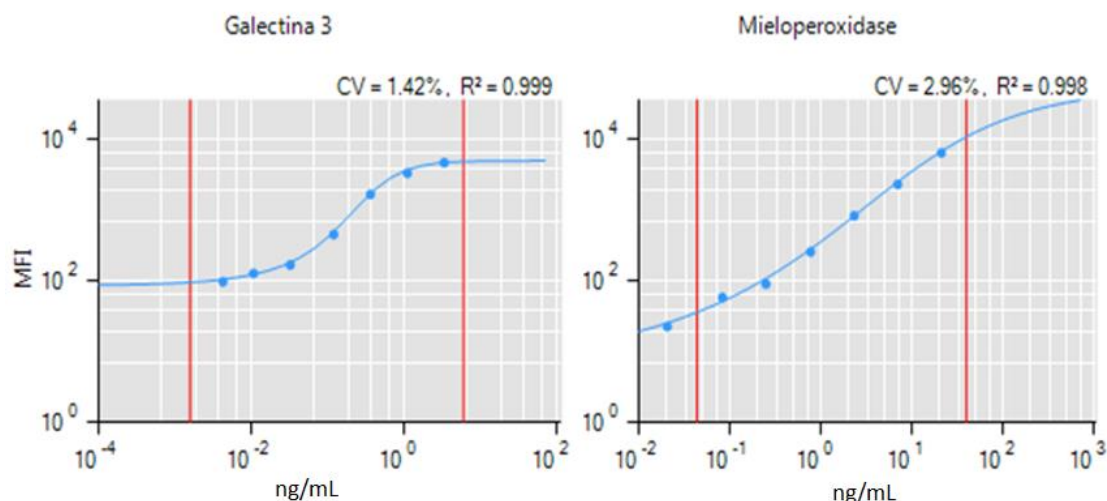
De forma resumida, o processo de montagem da placa incluiu a pipetagem de 25 µL de microesferas coloridas revestidas com anticorpos de captura contra Gal-3 e MPO em uma placa com 96 poços. A seguir, foram pipetadas 25 µL das amostras diluídas dos pacientes e incubadas em agitador de placas (IKA MTS 2/4 digital). Após ficar incubado por 18 horas à

4 °C, foram realizadas lavagens e adicionados 25 µL do anticorpo de detecção que foi acrescentado à placa e passou por novo período de incubação de 1 hora. As lavagens foram realizadas em uma lavadora magnética (Bio-plex PRO II Wash Station) e as microesferas permaneceram retidas na placa pela ação de um ímã. Posteriormente, foi adicionada 25 µL de estreptavidina-ficoeritrina, que emite sinal fluorescente quando excitada pelos LEDs do equipamento de leitura e incubada por um período de 30 minutos. Após a lavagem para remoção dos reagentes não aderidos, foram adicionados aos poços 100 µL de solução-tampão e incubadas por mais 5 minutos. Em seguida, a placa foi colocada para análise no equipamento do leitor de microesferas Magpix Milliplex (Luminex Corp, Austin, TX). Neste equipamento, 2 LEDs, um verde com comprimento de ondas de 525 nm identifica os biomarcadores, e um LED vermelho (635 nm) identifica a microesfera, além de uma câmera CCD que captura estas imagens e envia ao software Xponent 4.2 (Luminex Corp, Austin, TX). Posterior análise dos dados é realizada pelo software Milliplex Analyst 5.1 (EMD Millipore). As etapas de montagem da placa e posterior análise podem ser visualizadas nos dados da Figura 4, a seguir.



**Figura 4 -** Esquema ilustrativo das etapas de montagem à análise final dos dados obtidos no ensaio Luminex®

As concentrações das amostras desconhecidas são estimadas a partir da curva-padrão, utilizada com concentração conhecida e fornecida na bula dos kits utilizados. Neste ensaio, os níveis dos biomarcadores foram expressos em ng/mL de acordo com a curva padrão obtida na mesma placa, conforme os dados da Figura 5.



**Figura 5** - Curvas dos biomarcadores Gal-3 e MPO do ensaio Luminex®

Os limites de detecção dos biomarcadores de interesse do estudo, analisados pela metodologia xMAP da Luminex®, foram: Gal-3 de 3 ng/mL - 0,01 ng/mL e MPO de 20 ng/mL - 0,02 ng/mL). Para o ensaio realizado, a curva foi plotada no método 5-Plog.

Resumidamente, as amostras de plasma foram preparadas para análise em uma placa de 96 unidades, utilizando o Milliplex Map Human Circulating Cancer Biomarker Magnetic Bead Panel 3 (Millipore Corp, Billerica, MA, EUA), seguindo os protocolos especificados e providenciados pela Millipore. Analitos foram quantificados utilizando o instrumento do teste analítico Magpix, que utiliza tecnologia xMAP, perfis de analitos múltiplos (Luminex Corp., Austin, Tx), e xPONENT 4.2 software (Luminex). Tecnologia xMAP usou microesferas magnéticas coloridas e fluorescentes codificadas e revestidas com anticorpos de captura analito-específicos para simultaneamente avaliar múltiplos analitos em um único espécime. Após a microesfera ter capturado os analitos, anticorpos de

detecção ligam-se ao complexo. Posteriormente, a streptavidina liga-se como uma molécula de apresentação. Dentro do aparelho, camas magnéticas são mantidas em uma camada única por um magneto, onde duas LEDs são utilizadas para excitar o corante da microesfera interna e o corante da molécula de apresentação, respectivamente. Uma câmera CCD captura estas imagens, que são posteriormente analisadas pelo software Milliplex Analyt (Millipore). A concentração dos biomarcadores (ng/ml) foi determinada com base no ajuste de uma curva-padrão para intensidade fluorescente média versus ng/ml.

O ecocardiograma transtorácico foi realizado com o sistema comercialmente disponível (Envisor Philips, Philips Healthcare, Bothell, EUA). Todas as medidas foram feitas e relatadas, de acordo com as recomendações da *American Society of Echocardiography* <sup>(77)</sup> conforme dados da Tabela 4. Todos os ecocardiografistas que realizaram os exames no ICESP eram certificados e com ampla experiência na área, além disto, eram cegos para a avaliação das pacientes. A análise ecocardiográfica incluiu: 1) medidas das dimensões, espessuras de parede e volumes intracavitários; 2) avaliação das funções sistólica e diastólica do VE; 3) avaliação das velocidades de fluxos intracavitários. FEVE foi calculado pelo método de Simpson.

**Tabela 4 -** Parâmetros obtidos por ecocardiografia

<b>Parâmetros</b>	<b>Descrição</b>
<b>Morfométricos</b>	
DSVE, mm	Dimensão sistólica de VE
DDVE, mm	Dimensão diastólica VE
SPT, mm	Espessura septal
PP, mm	Espessura da parede posterior
AE, mm	Dimensão anteroposterior do átrio esquerdo
<b>Doppler</b>	
E, cm/s	Velocidade E
A, cm/s	Velocidade A
E/A	Relação E/A
TD onda E, ms	Tempo de desaceleração da onda E
e', cm/s	Velocidade e'
E/e'	Relação E/e'
<b>Função VE</b>	
FE, %	Fração de ejeção pelo método de Simpson

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Normalmente, os níveis de Gal-3 e MPO não são distribuídos e são apresentados como mediana (percentis 25th e 75th). Em razão da distribuição desviada para direita, os níveis de Gal-3 e MPO foram transformados em logaritmo para a análise.

Realizamos modelos de efeito misto para comparar as trajetórias destes biomarcadores ao longo do tempo entre os grupos. Consistentemente

com o estudo principal, no qual os níveis séricos de TnI transformados em logaritmo tinham uma trajetória bifásica ao longo do tempo, incluímos a variável tempo no modelo, como uma função quadrática (tempo e tempo ao quadrado) comparando as trajetórias dos níveis séricos de TnI transformados em logaritmo entre os grupos. Adicionalmente, testamos a não linearidade das trajetórias de logGal-3 e logMPO por meio da comparação do modelo quadrático – incluindo tempo ao quadrado – com modelo linear de teste de razão de probabilidade, e assumimos um comportamento linear se o valor fosse de  $p \geq 0,05$ . As trajetórias foram comparadas entre os grupos, utilizando o teste de razão de probabilidade entre o modelo com e sem termos de interação tempo-grupo e tempo-grupo ao quadrado.

Finalmente, avaliamos se as trajetórias dos níveis séricos de TnI transformados em logaritmo diferiam, de acordo com os níveis sanguíneos de MPO basal, categorizados como acima ou abaixo da média. Em razão do efeito conhecido de carvedilol sobre os níveis séricos de TnI, esta análise foi realizada separadamente nos grupos de tratamento placebo e carvedilol. Testamos se a magnitude do efeito de carvedilol diferia de acordo com níveis séricos de MPO basal por meio da realização do teste de razão de probabilidade entre um modelo com e sem termos de interação tempo-tratamento-MPO e tempo-tratamento-MPO ao quadrado. O mesmo procedimento foi realizado para comparar as trajetórias dos níveis séricos de TnI transformados em logaritmo de acordo com os níveis séricos de Gal-3. A



análise estatística foi realizada pela versão Stata 15.0 (StataCorp, College Station, Texas) e o nível de significância foi definido como  $p < 0,05$ .

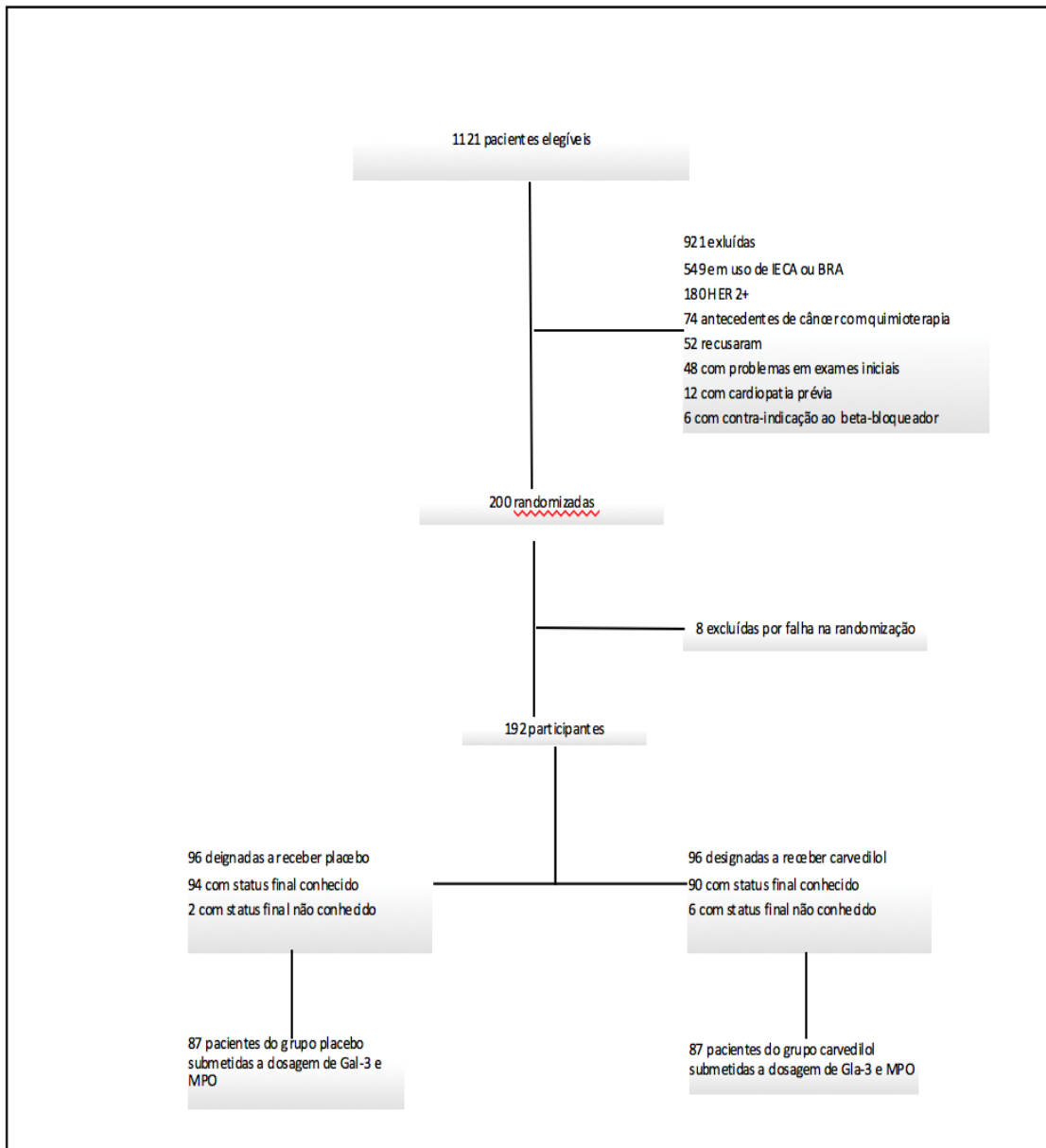
## **5 Resultados**

---

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 DADOS GERAIS**

Dentre os 192 pacientes participantes do estudo CECCY, conforme exposto previamente, todos foram submetidos à coleta de seis amostras de sangue que, em seguida, foram processadas. Mas, algumas não foram estocadas a -80 °C para posterior dosagem de MPO e Gal-3 em razão de problemas de logística. Dezesseis pacientes não tinham a primeira amostra (basal) disponível para análise, uma paciente teve a primeira amostra hemolisada e uma paciente faleceu antes da primeira coleta. No total, 174 pacientes foram incluídas neste estudo. Das 174 pacientes, 87 pertenciam ao grupo carvedilol e 87 ao grupo placebo, conforme os dados da Figura 6.



**Figura 6 -** Critérios de Seleção e Randomização. A análise por intenção de tratar incluiu todas as pacientes que preenchiem os critérios de inclusão e apresentaram randomização válida. As exclusões por randomização inválida representaram pacientes que tiveram mudança no esquema quimioterápico (quatro), ou apresentaram erro no estado da menopausa (quatro)

## 5.2 DESFECHO PRIMÁRIO

Durante os 6 meses de seguimento, 26 pacientes (14,9%) apresentaram uma queda de, pelo menos, 10% de FEVE, após o início da quimioterapia. Entre estas, não houve diferença significativa nos valores de MPO e Gal-3, quando comparadas com os 148 pacientes sem queda de FEVE ( $p=0,85$  para MPO e  $p= 0,85$  para Gal-3), conforme os dados da Tabela 5.

**Tabela 5** - Queda de FEVE em relação ao comportamento dos biomarcadores

Queda da FEVE baseada no comportamento dos biomarcadores			
	Sem Queda FEVE	Queda FEVE $\geq$ 10%	Valor p
	N=148	N=26	
<b>Galectina - 3 ng/ml</b>			0,85
Basal	6,3 [5,2 - 10,0]	6,3 [5,0 - 8,8]	
12 semanas	12,4 [9,8 - 16,1]	11,0 [9,8 - 14,2]	
24 semanas	10,3 [7,6 - 12,8]	10,4 [8,5 - 12,6]	
<b>Myeloperoxidase ng/ml</b>			0,85
Basal	13,2 [7,5 - 26,0]	13,3 [10,8 - 18,7]	
12 semanas	18,1 [12,3 - 39,1]	14,1 [10,4 - 25,5]	
24 semanas	20,5 [10,5 - 37,8]	16,3 [10,3 - 35,6]	

### 5.3 DESFECHOS SECUNDÁRIOS

Houve aumento dos biomarcadores em ambos os grupos, embora tenha ocorrido um aumento linear de MPO e um aumento seguido de platô na Gal-3, conforme os dados da Figura 7. Os níveis séricos de MPO [basal: 13,2 (7,9; 24,8), 3 meses: 17,7 (11,1; 31,1), 6 meses: 19,2 (11,1; 37,8) ng/mL] e Gal-3 [basal: 6,3 (5,2; 9,6), 3 meses: 12,3 (9,8; 16,0), 6 meses: 10,3 (8,2; 13,1) ng/mL] aumentaram após quimioterapia com ANT, e as alterações longitudinais foram similares entre o grupo placebo e o grupo cardvedilol (p para interação: 0,28 e 0,32, respectivamente), conforme os dados da Tabela 6.

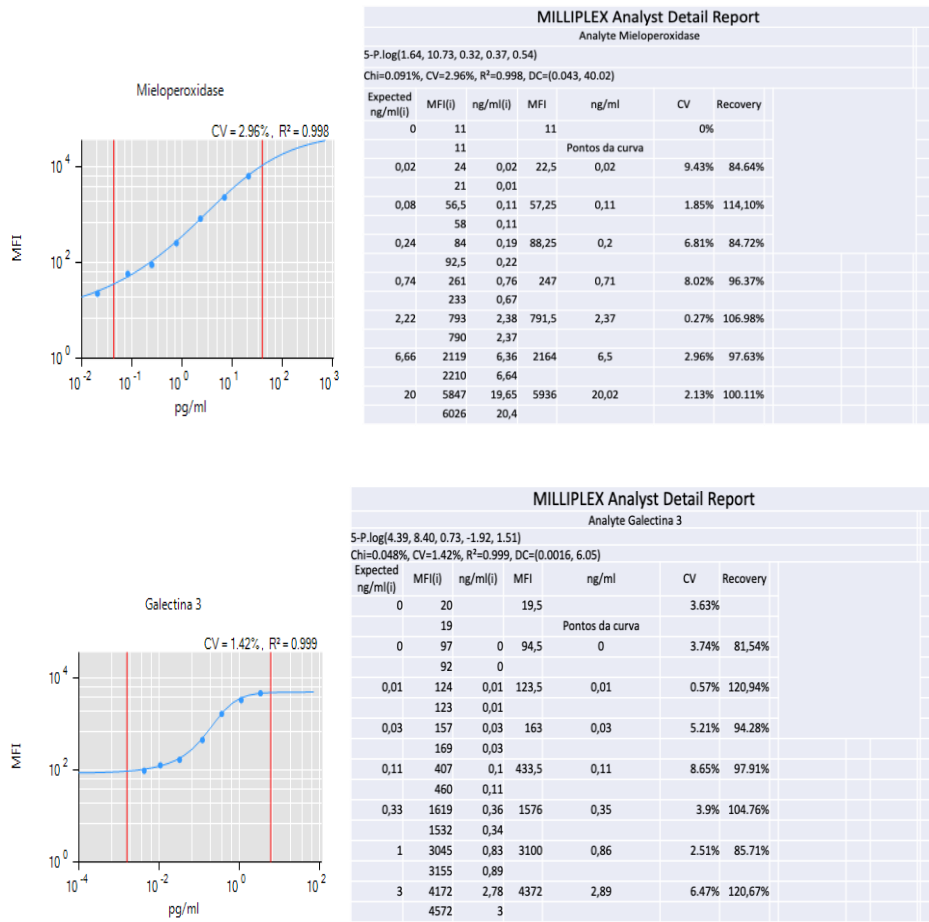


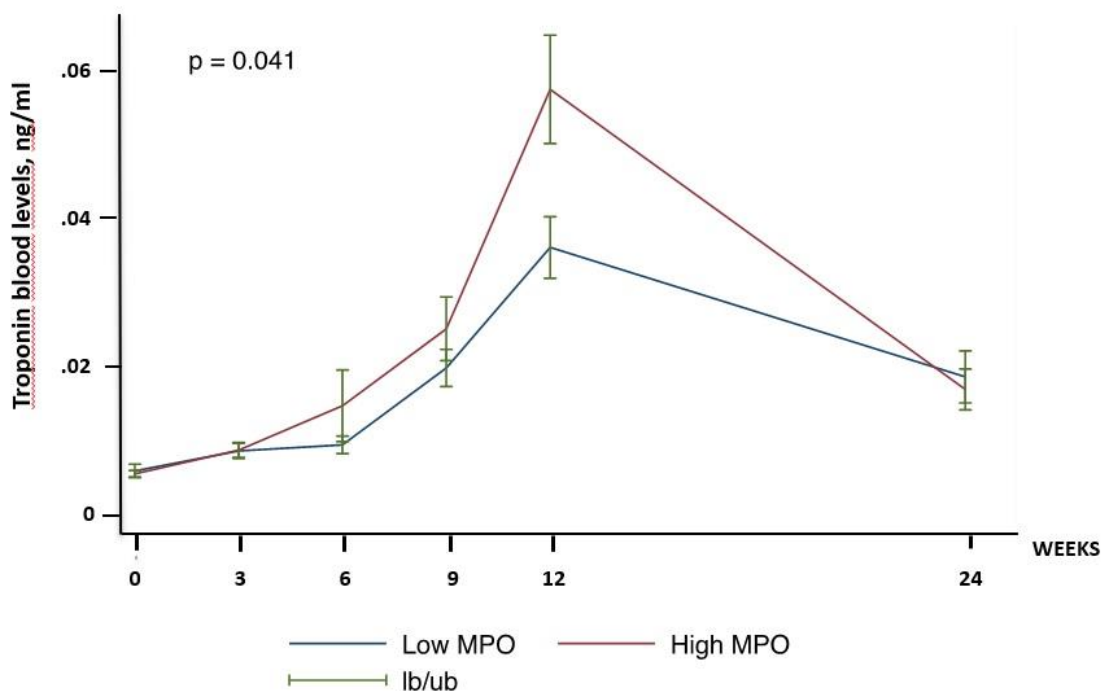
Figura 7 - Gráficos e tabelas da dosagem kit Milliplex de MPO e Gal-3

**Tabela 6** – Efeito do carvedilol nos níveis de Gal-3 e MPO

<b>Efeito do Carvedilol sobre Galectina-3 e Mieloperoxidase</b>			
	<b>Placebo</b>	<b>Carvedilol</b>	<b>Valor p</b>
	N=87	N=87	
<b>Galectina - 3 ng/ml</b>			0,32
Basal	6,3 [5,2 - 9,2]	6,4 [5,1 - 10,8]	
12 semanas	11,8 [10,2 - 15,9]	12,9 [9,1 - 16,2]	
24 semanas	11,2 [8,4 - 12,8]	10,3 [7,5 - 13,1]	
<b>Myeloperoxidase ng/ml</b>			0,28
Basal	13,3 [7,6 - 21,0]	13,2 [8,5 - 29,2]	
12 semanas	15,3 [11,0 - 25,5]	20,9 [11,2 - 39,1]	
24 semanas	19,6 [11,9 - 37,7]	19,2 [10,6 - 43,7]	



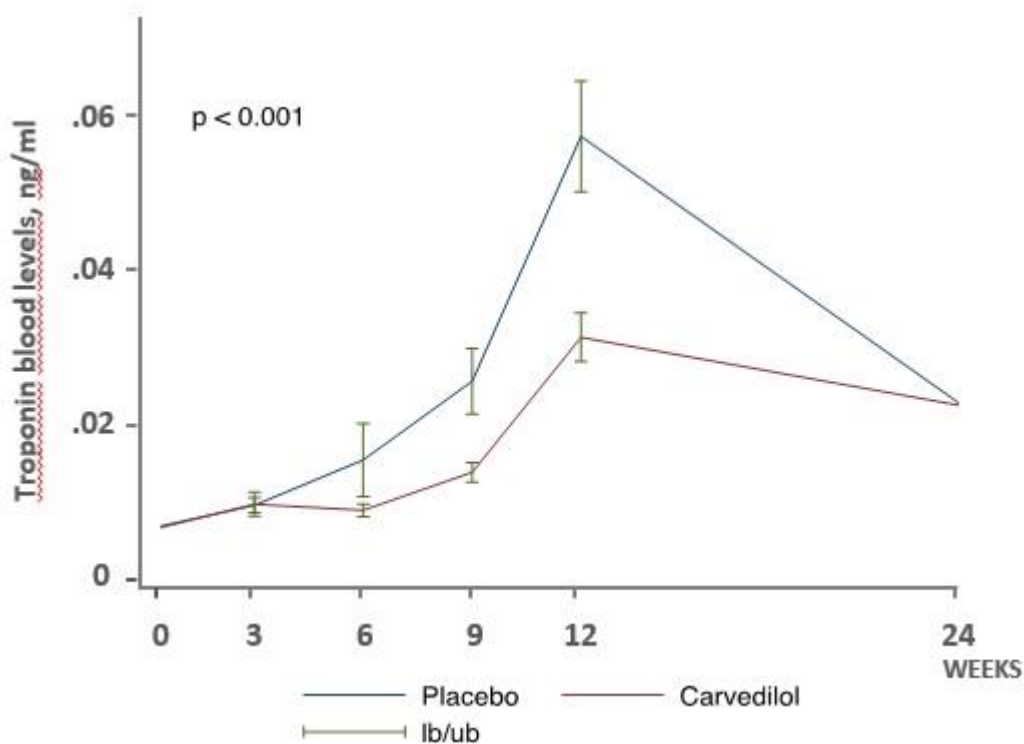
Como não há valor de corte considerado normal para os biomarcadores Gal-3 e MPO na literatura, foi realizada uma análise exploratória na tentativa de correlacionar o valor basal dos biomarcadores com a injúria miocárdica. Os resultados da dosagem dos biomarcadores MPO e Gal-3 foram divididos em dois grupos: acima e abaixo da média. No grupo placebo, mulheres com níveis séricos basais de MPO altos (acima da média) demonstraram um maior aumento nos níveis séricos de TnI do que aqueles com níveis séricos basais de MPO baixos (abaixo da média) ( $p=0,041$ ) conforme os dados da Figura 8.



MPO – mileoperoxidase, TnI – troponina I, low MPO – MPO abaixo da média, high MPO - MPO acima da média , ng/ml – nanogramas/mililitro

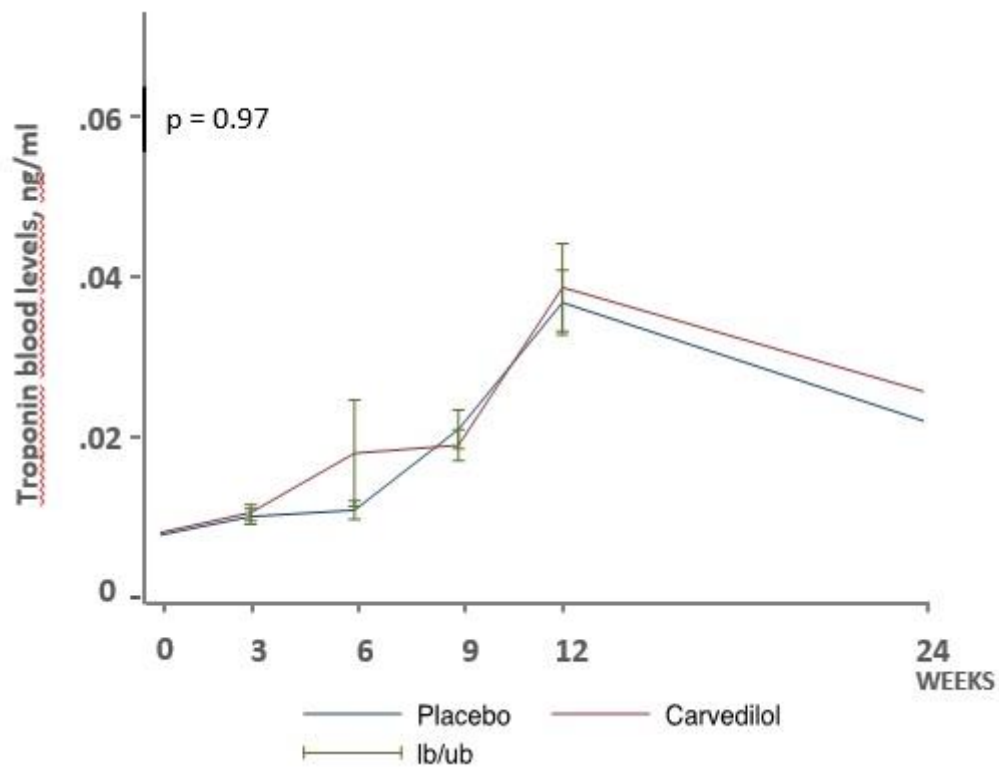
**Figura 8** - Níveis séricos basais altos e baixos de MPO em relação a TnI

Comparado com placebo, carvedilol reduziu de forma significativa os níveis séricos de TnI em mulheres com valores séricos basais de MPO acima da média ( $p < 0,001$ ) conforme os dados da Figura 9, mas não reduziu os níveis séricos de TnI em mulheres com valores séricos basais de MPO abaixo da média ( $p = 0,97$ ; valor de  $p$  para interação =  $0,009$ ) conforme os dados da Figura 10. Não houve interação significativa entre os níveis séricos basais acima e abaixo da média de Gal-3 e tratamento com carvedilol (valor de  $p$  para interação =  $0,99$ ).



MPO – Mieloperoxidase, TnI – Troponina I, ng/ml – nanograma/mililitro

**Figura 9** - Pacientes com níveis séricos de MPO basal acima da média nos grupos placebo e carvedilol e sua relação com níveis séricos de TnI



MPO – Mieloperoxidase, TnI – Troponina I, ng/ml – nanograma/mililitro

**Figura 10** - Pacientes com níveis séricos de MPO basal abaixo da média nos grupos placebo e carvedilol e sua relação com níveis séricos de TnI

## **6 Discussão**

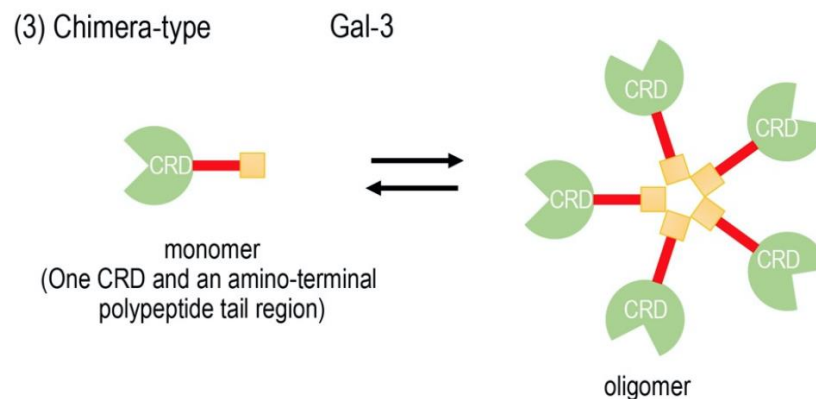
---

## 6 DISCUSSÃO

O principal resultado desta análise *post hoc* do estudo CECCY foi a de que os níveis séricos dos biomarcadores de fibrose (Gal-3) e estresse oxidativo (MPO) não se correlacionaram com o desenvolvimento da cardiotoxicidade, assim como não houve efeito direto de carvedilol em relação ao comportamento dos níveis dos biomarcadores Gal-3 e MPO, quando avaliados de forma geral. Entretanto, constatou-se um aumento dos níveis séricos de MPO e Gal-3, após o início da quimioterapia. Quando realizada a análise de pacientes com níveis basais elevados (acima da média) de MPO, houve maior aumento de TnI neste subgrupo, refletindo maior injúria miocárdica após a quimioterapia para câncer de mama com ANT. Ademais, a utilização de carvedilol, como prevenção primária foi superior ao placebo neste subgrupo. Esta relação entre níveis basais elevados com maior aumento na TnI e melhor resposta ao carvedilol não foi observada com Gal-3.

Galectinas são compostas por uma família de proteínas  $\beta$ -galactosidases ligadas à lecitina. Gal-3 ou galectina tipo chimera é caracterizada por ter um único domínio de reconhecimento de carboidrato (DRC) e um polipeptídeo amino-terminal na região da cauda, conforme os dados da Figura 11. Gal-3 é expresso por uma variedade de células imunes, incluindo mastócitos, histiócitos e macrófagos que estão associados ao sistema fagocítico em vários tecidos. Embora seja predominantemente presente como proteína citosólica, também é expresso na superfície celular

e secretado no plasma por várias células, tendo um papel relevante no crescimento e diferenciação celular, ativação de macrófagos, angiogênese, apoptose e atividade antimicrobiana, assim como mediador de resposta inflamatória local em condições patológicas diversas <sup>(79)</sup>. Estudos sugerem que esteja envolvido na fibrogênese e resposta inflamatória na insuficiência cardíaca, estimulando os fibroblastos dos cardiomiócitos a proliferarem e depositarem colágeno. Do ponto de vista fisiopatológico, Gal-3 aumenta a fibrose cardíaca e influencia a resposta imune, levando a remodelamento cardíaco prejudicial <sup>(58, 59, 60)</sup>.



**Figura 11** - Estrutura química da Galectina-3

O presente estudo demonstrou um aumento dos níveis séricos de Gal-3 ao longo do tratamento com ANT, embora não tenha sido encontrada correlação entre os níveis basais de Gal-3 e CTX, comportamento da TnI e utilização de carvedilol. Nem após a realização da análise com níveis basais séricos de Gal-3 acima da média, estabeleceu-se esta relação. Uma das possíveis explicações seja o curto seguimento (apenas 6 meses) do estudo,

visto tratar-se de um marcador de fibrose, além da baixa incidência de CTX registrada. Outra possível justificativa é de que a injúria miocárdica provocada por doses utilizadas atualmente de ANT, não seja de magnitude suficiente para induzir fibrose e aumentar significativamente Gal-3. Desta forma, a relação entre a mesma e o desenvolvimento de CTX pode ter sido comprometido.

Diversos estudos demonstraram relação entre Gal-3 e insuficiência cardíaca. O estudo DEAL-HF foi um estudo duplo-cego, randomizado, placebo-controlado que avaliou 240 pacientes com IC classe funcional (CF) III e IV entre 2000 e 2003, para um programa de manejo da IC. Após descartar oito amostras insuficientes, 232 pacientes foram submetidos à dosagem de Gal-3 em apenas uma única amostra. Neste estudo, estabeleceu-se o limite de 17,7 ng/ml de Gal-3 e 49% dos pacientes tiveram níveis acima deste valor. Fatores associados a maiores níveis séricos foram: idade, insuficiência renal e níveis mais elevados de NT-proBNP. Não houve correlação entre os níveis de Gal-3 e FEVE. Este estudo demonstrou que Gal-3 foi preditor independente de mortalidade em pacientes com IC crônica moderada e avançada de origem isquêmica e não-isquêmica. A mortalidade foi maior em pacientes com maior nível sérico de Gal-3 e NT-proBNP. Quando foi realizada a dicotomia dos valores basais entre abaixo e acima da média, observou-se que Gal-3 acima da média foi associado a um risco de 1.5 a 2 vezes maior de mortalidade comparado aos pacientes da outra categoria <sup>(61)</sup>.

Em um subestudo do PRIDE (Pro-BNP Investigation of Dyspnea in the Emergency Department) <sup>(78)</sup>, que avaliou 599 pacientes com dispnéia no departamento de emergência com seguimento por 60 dias após admissão, foram coletadas e congeladas a -80°C amostras de NT-proBNP e Gal-3. 209 (35%) dos pacientes tiveram IC aguda como diagnóstico final. Valores de Gal-3 nestes pacientes, assim como NT-proBNP foram significativamente maiores em pacientes com IC aguda (9,2 pg/ml vs. 6.9 pg/ml,  $p < 0,001$ ) e estabeleceram Gal-3 como preditor independente de mortalidade a curto prazo (60 dias) em pacientes com IC aguda <sup>(62)</sup>. Além destes estudos demonstrarem que Gal-3 é marcador prognóstico em IC, estudo prévio de Jagodzinski demonstrou relação da concentração sérica de Gal-3 com ocorrência futura de manifestação clínica de IC. Gal-3 foi dosado em 8.444 participantes e foi preditor de evento cardiovascular, porém com poder preditivo menor que o NT-proBNP <sup>(63)</sup>.

Em relação à CTX, Gal-3 já foi testado como preditor, porém com resultados conflitantes. Ky e colaboradores na tentativa de prever declínio subsequente na função ventricular de pacientes em tratamento ambulatorial de câncer de mama HER2 positivo, submetidas a tratamento com ANT e trastuzumab, avaliaram sete biomarcadores em 78 mulheres provenientes de quatro centros dos Estados Unidos da América. As amostras de sangue foram obtidas antes do início do tratamento, após 3 e 6 meses e congeladas a -80 °C até o momento da dosagem. Em um follow-up de um período de até 15 meses, 23 pacientes (24%) desenvolveram CTX. Neste estudo, CTX era definido como declínio  $\geq 5\%$  para uma FEVE  $< 55\%$  com sintomas de IC ou



redução  $\geq 10\%$  para FEVE  $< 55\%$  em pacientes assintomáticos. A redução média de FEVE dos pacientes que desenvolveram CTX foi 15%, e o tempo médio para desenvolver o evento foi 7,9 meses. Não foi encontrada relação entre níveis séricos basais de Gal-3 e CTX em seguimento de 6 meses <sup>(55)</sup>. A mesma população foi reavaliada em seguimento prolongado de 15 meses e Gal-3 não foi capaz de prever CTX em análise uni e multivariada <sup>(56)</sup>.

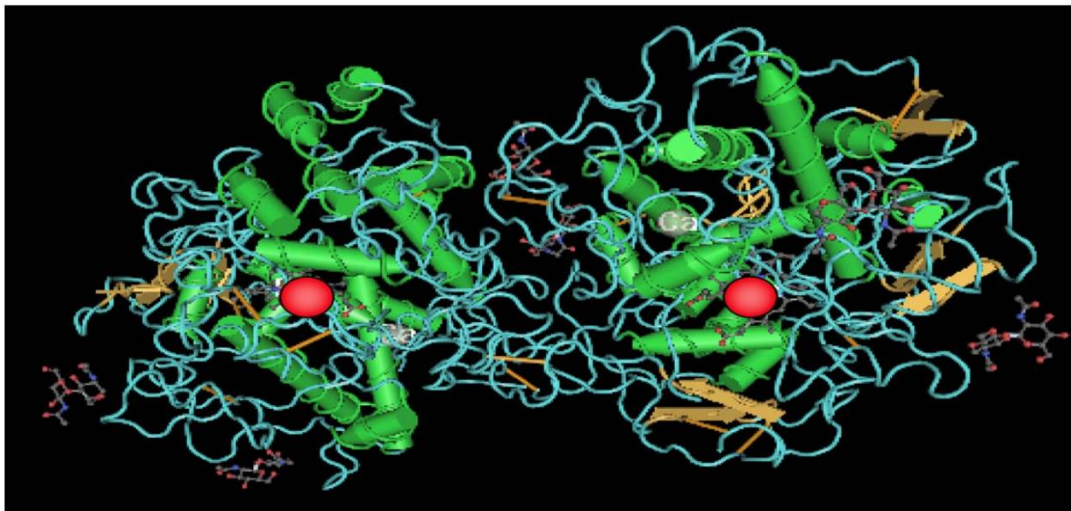
Um subestudo do PRADA avaliou a correlação entre diversos biomarcadores (troponina I e T, BNP, NT-proBNP, PCR e Gal-3) e CTX. O valor de todos os biomarcadores testados aumentou até o término da terapia com ANT, embora a elevação de Gal-3 não tenha sido dose-dependente. O mesmo subestudo avaliou a relação entre a utilização de candesartana e metoprolol e o comportamento dos biomarcadores e, embora a elevação dos níveis de TnI e TnT tenham sofrido menor elevação no grupo tratado com metoprolol, a terapia medicamentosa não influenciou o comportamento de Gal-3, além de não ter sido encontrada correlação entre o tratamento e a queda de FEVE <sup>(42)</sup>.

Em contraste, Bulten e colaboradores baseados na hipótese de que a CTX mediada por ANT seja secundária à formação do complexo topoisomerase-II $\beta$ -doxorubicina, que seria responsável pela morte celular e ativação da cascata de liberação de citocinas e norepinefrina, utilizaram cintilografia <sup>123</sup>I metaiodobenzilguanidina e biomarcadores para detectar precocemente CTX. Cinquenta e nove mulheres que apresentaram câncer de mama entre outubro de 2010 e maio de 2012, submetidas à terapia com ANT, foram incluídas neste estudo. Em um seguimento de 12 meses,

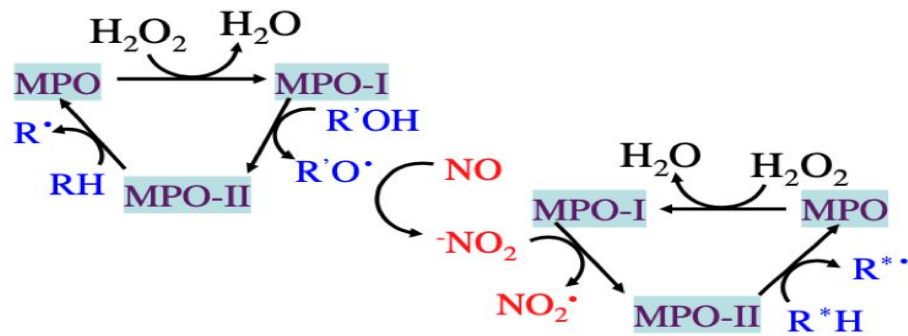
acompanhadas com cintilografia  $^{123}\text{I}$  metaiodobenzilguanidina ( $^{123}\text{I}$ -mIBG) e comparadas com ecocardiograma transtorácico (Eco TT) com strain, Gal-3 foi o único biomarcador que demonstrou correlação significativa com  $^{123}\text{I}$ -mIBG <sup>(59)</sup>.

Mieloperoxidase (MPO) pertence à família das peroxidases, que também incluem lactoperoxidase, peroxidase eosinofílica e tireoidoperoxidase. É armazenada em neutrófilos polimorfonucleares (PMN) e, como representa 5% do total proteico, é uma das mais abundantes proteínas nestas células. Também é armazenada em monócitos e macrófagos teciduais. Durante a ativação celular e degranulação, MPO é liberada em vacúolos fagocíticos, assim como no espaço intracelular. A estrutura da enzima é um homodímero de 140-kDa, e cada monômero consiste em uma subunidade de cadeia pesada (55-64kDa, 466 aminoácidos) e uma leve (10-15kDa, 108 aminoácidos). A estrutura secundária da MPO é, predominantemente,  $\alpha$ -helicoidal, e cada monômero consiste de um núcleo central de cinco hélices e um grupo heme (Figura 12). O chamado sistema MPO consiste na enzima MPO, peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e cofatores oxidáveis, conforme os dados da Figura 13. Em seu estado basal, a MPO armazena o ferro na forma férrica [MPO-Fe(III)], que se torna oxidado na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o principal substrato das peroxidases. Pela oxidação da  $\text{H}_2\text{O}_2$ , MPO é transformada em um composto redox intermediário de vida curta chamado de composto I que prontamente oxida uma variedade de substratos como haletos (ex.  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{I}^-$ ) ou pseudo-haletos (ex.  $\text{SCN}^-$ ). Em razão da abundância de cloreto nos fluídos fisiológicos como

o plasma, o mesmo representa o principal substrato fisiológico da MPO. Esta oxidação resulta na formação de ácido hipocloroso (HOCl), que tem papel importante para as propriedades microbicidas e virucidas dos neutrófilos. Adicionalmente, o composto I oxida numerosos substratos orgânicos e inorgânicos, gerando o composto II [MPO-Fe(IV)=O]. Outro substrato fisiológico importante do composto I é o óxido nítrico (NO), que é oxidado em nitrito ( $\text{NO}_2^-$ )<sup>(80)</sup>. Mieloperoxidase (MPO) portanto, é uma enzima derivada do leucócito, liberada de neutrófilos e monócitos ativados, produzidos secundariamente à resposta inflamatória e estresse oxidativo<sup>(46, 47)</sup>.



**Figura 12 -** Estrutura molecular MPO



**Figura 13 - Sistema MPO**

No presente estudo, os níveis séricos de MPO não se correlacionaram com o desenvolvimento de cardiotoxicidade, assim como não houve efeito direto de carvedilol sobre o comportamento da MPO, quando avaliados de forma geral. Entretanto, constatou-se um aumento dos níveis séricos de MPO após o início da quimioterapia. Embora a MPO não tenha apresentado relação com a queda de FEVE, a dicotomia entre abaixo e acima da média nos permitiu constatar que mulheres com valores de MPO acima da média sofreram maior injúria miocárdica e, talvez por este fato, foram as que mais se beneficiaram da terapia com carvedilol para prevenção primária.

Esta correlação entre Tnl e MPO já havia sido relatada em estudos anteriores de CTX <sup>(55, 56)</sup>. Esse valor adicional ao identificar pacientes mais susceptíveis à injúria miocárdica é o que torna este grupo mais propenso ao benefício da prevenção primária. Por ser um marcador de inflamação, à medida que a mesma e o stress oxidativo aumentam, estes pacientes obtém melhor resposta à terapia com carvedilol, que tem efeito anti-oxidante. A não

correlação com a queda de FEVE, possivelmente, foi consequente à baixa incidência de CTX no estudo CECCY.

O aumento nos níveis de MPO foi relacionado a diversas doenças cardiovasculares. Brennan e cols., pela constatação da elevação da MPO em lesões ateroscleróticas culpadas que sofreram fissura ou ruptura em pacientes com morte súbita de causa cardiovascular, avaliaram a MPO em 604 pacientes sequenciais que se apresentaram à emergência com dor torácica. O nível sérico plasmático inicial da MPO foi preditora de risco para infarto agudo do miocárdio (IAM), mesmo em pacientes com TnT basal negativa ( $p < 0,001$ ). MPO basal também foi preditor de risco de eventos cardiovasculares maiores (IAM, necessidade de revascularização ou morte) com 30 dias e 6 meses de apresentação <sup>(48)</sup>. Tang e cols. avaliaram 140 pacientes com ICFER (insuficiência cardíaca com fração de ejeção reduzida) e ecocardiograma com FEVE  $< 35\%$ . Neste estudo, níveis séricos da MPO elevados foram associados com maior gravidade de IC, além de maior probabilidade de desfechos clínicos adversos como morte cardiovascular <sup>(49)</sup>. Em estudo de 2007, o mesmo autor correlacionou os valores da MPO com parâmetros ecocardiográficos de performance sistólica e diastólica, assim como desfecho a longo prazo (morte, transplante cardíaco ou hospitalização por IC). A relação com parâmetros de ecocardiograma e desfechos cardiovasculares foi mantida <sup>(51)</sup>. Em estudo de Reichlin e cols. foram investigados a acurácia e o valor prognóstico da MPO em pacientes com IC aguda. Seiscentos e sessenta e sete pacientes com dispneia que se apresentaram ao departamento de emergência foram randomizados de

forma prospectiva e acompanhados por 1 ano. Na admissão, MPO e BNP foram dosados. Os níveis de MPO foram similares em pacientes com IC aguda e com dispneia não cardiogênica, e a acurácia diagnóstica de MPO foi inferior a BNP. Mas, em pacientes com IC aguda, MPO acima do tercil inferior (>99 pmol/L) foi associada a um aumento significativo de mortalidade em 1 ano, tendo um papel preditivo adicional ao BNP <sup>(46)</sup>. Quando utilizada em pacientes com síndrome coronariana aguda, MPO foi preditora de risco cardíaco independente em 30 e 180 dias de seguimento <sup>(52)</sup> e também preditora de mortalidade em pacientes com doença coronariana <sup>(53)</sup>. Adicionalmente, os níveis de MPO são significativamente mais elevados em pacientes com placas instáveis <sup>(54)</sup>.

Quanto à relação de MPO com CTX, estudos recentes fizeram esta correlação. Ky e colaboradores, no mesmo estudo que avaliou Gal-3, descreveram uma melhora no valor preditivo de TnI quando adicionado ao aumento do nível sérico da MPO em mulheres com câncer de mama tratadas com doxorubicina e trastuzumabe <sup>(55)</sup>. Durante o seguimento a longo prazo (15 meses) do mesmo estudo, MPO permaneceu como preditora de CTX e foi o único biomarcador testado que manteve a relação durante todo o seguimento <sup>(56)</sup>.

Em relação às antraciclina, diversas hipóteses vêm sendo aventadas a respeito de seu mecanismo de lesão e a consequente injúria miocárdica com elevação de biomarcadores. A doxorubicina (DOX) sofre redução pela ação da NADH desidrogenase para formar um radical semiquinona <sup>(25)</sup>. O peróxido de hidrogênio resultante pode ser convertido em radicais livres

tóxicos na presença de ferro intracelular (via enzimática). Além disso, a DOX forma complexos diretamente com o ferro para gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) <sup>(26)</sup> (via não enzimática). Ao se ligar à base do DNA e estabilizar o complexo de topoisomerase 2 $\alpha$  (Top2 $\alpha$ ), após a clivagem do DNA, esses complexos aumentam a quebra das fitas duplas do DNA e previnem a síntese do RNA e DNA das células cancerígenas <sup>(27)</sup>. O mesmo acontece nos cardiomiócitos com a ligação da DOX a Top2 $\beta$ , levando à injúria das células miocárdicas. Acúmulo de ferro intramitocondrial está associado com aumento da produção de ROS <sup>(28)</sup>. A produção de ROS é prejudicial, mas ainda é incerto em que grau é causa ou consequência de injúria celular mediada pela ANT <sup>(29)</sup>, conforme os dados da Figura 14.

Evidências recentes sugerem que os efeitos deletérios da ANT podem ser mediados pelos efeitos que a mesma exerce sobre as células endoteliais. Ocorre secundariamente ao aumento da permeabilidade destas células e, conseqüentemente, prolongando a exposição dos cardiomiócitos à DOX, permitindo um maior dano direto aos miócitos. ROS é a principal molécula efetora da ANT, agindo por meio do prejuízo das funções endoteliais dos cardiomiócitos e promovendo a inibição de derivados do endotélio, como entotelina-1, prostaglandina I<sub>2</sub> e produção de óxido nítrico endotelial. O desbalanço bioquímico reduz a sobrevivência e a adaptabilidade dos cardiomiócitos <sup>(30)</sup>, que são mais suscetíveis à lesão por radicais livres em razão de seu alto metabolismo oxidativo e das poucas defesas antioxidantes <sup>(31)</sup>, conforme os dados da Figura 15. Estudos translacionais recentes têm por objetivo identificar novos marcadores de

stress oxidativo no contexto da cardiotoxicidade induzido por ANT. O mecanismo de injúria miocárdica da ANT ajuda a explicar nossos resultados em relação à MPO, ao trazer um biomarcador de stress oxidativo, como preditor de injúria miocárdica em conjunto com a troponina.

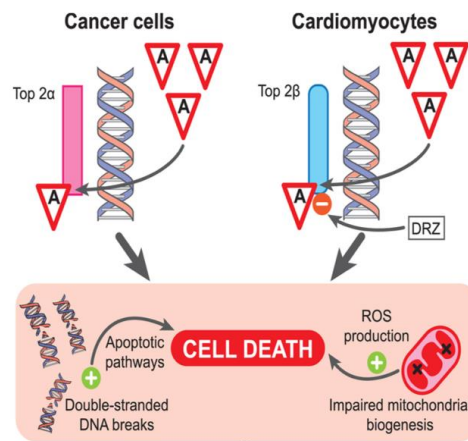


Figura 14 - Fisiopatologia do modelo de cardiotoxicidade 1 (32)

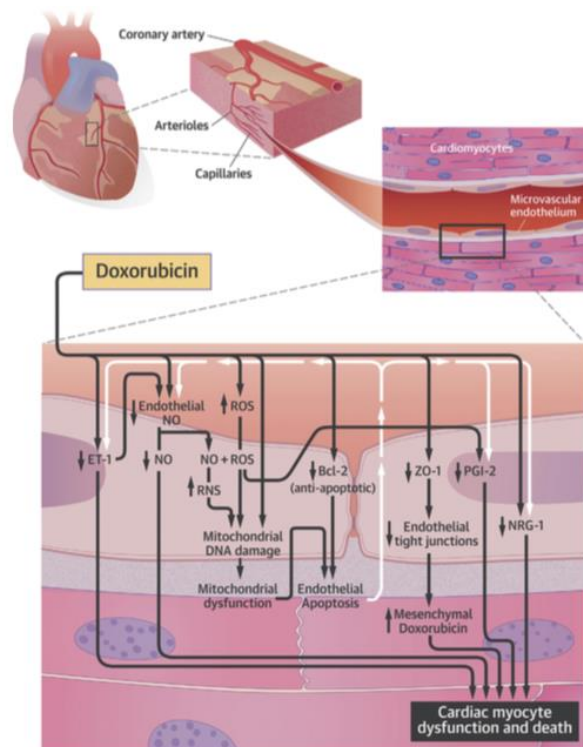


Figura 15 - Fisiopatologia do modelo de cardiotoxicidade 2 (30)



Em pequenos estudos prévios, betabloqueadores mostraram potencial benefício na prevenção da cardiotoxicidade induzida por antraciclinas. Kalay e colaboradores randomizaram 25 pacientes em cada grupo para receber baixas doses de CVD (12,5 mg 1 vez ao dia) versus placebo durante 6 meses, demonstrando que o CVD foi eficaz na prevenção de CTX ( $p < 0,001$  para redução de FEVE) <sup>(68)</sup>. El-Shitany e colaboradores investigaram o efeito protetor do CVD na disfunção ventricular induzida por DOX em 50 crianças com leucemia linfoblástica aguda e demonstraram que houve melhora da função ventricular pelo Eco TT, além de evitar o aumento de Tnl <sup>(69)</sup>. Nabati e colaboradores randomizaram 91 pacientes em estudo cego unilateral para placebo versus CVD e demonstraram que a Tnl foi significativamente maior no grupo controle, além de queda de FEVE menor no grupo intervenção <sup>(70)</sup>. O estudo OVERCOME avaliou 90 pacientes com FEVE normal, recém diagnosticados com leucemia aguda (n=36) ou neoplasias hematológicas submetidos a transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas (n=54). O grupo foi randomizado para tratamento com enalapril e carvedilol (n=45) versus grupo controle (n=45). O desfecho primário foi a mudança absoluta de FEVE basal avaliado com ecocardiograma e ressonância nuclear magnética (RNM) antes do tratamento e após 6 meses. FEVE não sofreu alteração no grupo intervenção, porém apresentou queda significativa no grupo-controle resultando em uma diferença absoluta de -3,1 pela ecocardiografia ( $p=0,035$ ) e -3,4 ( $p=0,09$ ) quando avaliado pela RNM. Apesar da média de queda de FEVE ter sido modesta, houve uma queda significativamente

menor de FEVE no grupo intervenção comparado com o grupo placebo. Quando se comparou queda de FEVE  $\geq 10\%$  para FEVE  $< 50\%$  ( $p=0.9$ ) ou queda de FEVE  $\geq 10\%$ , porém, com FEVE  $\geq 50\%$  ( $p=0.22$ ) não houve diferença entre os grupos. Portanto, este estudo não demonstrou proteção do efeito de enalapril e carvedilol, como prevenção primária quando o critério avaliado foi cardiotoxicidade <sup>(41)</sup>.

Estudo de Cardinale e cols. utilizou enalapril como prevenção primária, após fazer a seleção dos pacientes mais propensos a desenvolver cardiotoxicidade. Neste estudo, dentre os 473 pacientes portadores de câncer submetidos à quimioterapia com altas doses de antraciclina que foram selecionados para randomização, apenas 114 pacientes apresentaram elevação de Tnl. Cinquenta e seis pacientes foram randomizados para o grupo IECA (enalapril 20 mg ao dia) e 58 para o grupo controle, com seguimento de 12 meses. O desfecho primário (queda de FEVE  $> 10$  pontos percentuais em relação a FEVE basal com declínio para valores abaixo do normal) foi significativamente maior no grupo controle comparado ao grupo intervenção (43% versus 0%;  $p<0.001$ ) <sup>(72)</sup>. Apesar do resultado benéfico de enalapril, a dose da ANT utilizada na época do estudo era maior que a empregada atualmente, o que justifica um maior número de pacientes desenvolverem CTX e um maior potencial benefício da terapia profilática. Além deste fator, a escolha de pacientes que sofreram injúria miocárdica pela dosagem de troponina, selecionou pacientes mais graves. Mas, na prática, esta curva de Tnl é inviável, visto que no referido estudo os

pacientes encontravam-se internados e foram submetidos à dosagem de TnI antes da quimioterapia, 12, 24, 36 e 72 horas após a mesma.

Estudos com maior número de pacientes foram realizados na tentativa de consolidar o  $\beta$ -bloqueador como medicação para prevenção primária na cardiotoxicidade secundária à doxorrubicina. O estudo PRADA foi um estudo randomizado, placebo-controlado, duplo-cego e 2x2 fatorial, que avaliou 130 mulheres adultas diagnosticadas com câncer de mama e sem comorbidades graves, com o objetivo de avaliar candesartana e succinato de metoprolol para prevenção primária de cardiotoxicidade. Foram randomizadas para quatro grupos: 33 pacientes para o grupo candesartana-metoprolol, 33 pacientes para candesartana-placebo, 32 pacientes para metoprolol-placebo e 33 pacientes para placebo-placebo com objetivo de titulação de dose de 32 mg com candesartana e 100 mg de metoprolol. O desfecho primário foi queda de FEVE da medida basal até o término da terapia adjuvante. Não foi demonstrado efeito de succinato de metoprolol sobre o declínio de FEVE (queda de 1,6 no grupo tratamento e 1,8 no grupo placebo;  $p=0,77$ ) e, embora não tenha prevenido a cardiotoxicidade em relação ao placebo, o grupo candesartana apresentou queda significativamente menor de FEVE comparado ao controle (queda de 2,6 grupo placebo e 0,8 no grupo tratamento;  $p=0,026$ )<sup>(71)</sup>. Tanto TnT como TnI apresentaram maior elevação no grupo placebo comparados ao grupo succinato de metoprolol<sup>(42)</sup>. Posteriormente, seguimento de 6 meses do estudo CECCY, que até o momento foi o maior estudo em prevenção primária de cardiotoxicidade secundária à ANT, demonstrou que poucos

pacientes apresentaram redução precoce de FEVE (14.5% grupo carvedilol versus 13,5% grupo placebo;  $p=1,0$ ), porém o aumento nos níveis séricos de TnI foi menor no grupo intervenção ( $p=0.003$ )<sup>(36)</sup>. Estes resultados podem ser consequência de baixas doses das antraciclinas empregadas e da predominância de pacientes mais jovens e sem comorbidades na população estudada. Além disso, a queda discreta de FEVE mesmo no grupo placebo reduziu o poder estatístico destes estudos para determinar diferenças entre os grupos, visto que o cálculo da amostra foi baseado em previsão de maior queda de FEVE. Avaliados em conjunto, estes dois estudos demonstram de forma consistente que doses contemporâneas da ANT são associadas com redução modesta de FEVE e que a ocorrência de queda significativa da mesma, compatível com diagnóstico de CTX é um evento raro, especialmente, a curto prazo.

Embora estudos prévios relacionem o aumento de Tn a CTX futura<sup>(40, 43, 44)</sup>, a elevação de Tn em estudos mais recentes não se correlacionou com disfunção ventricular significativa em razão da modesta elevação da mesma. A elevação discreta de Tn foi secundária sobretudo às baixas doses das antraciclinas utilizadas e inclusão de pacientes sem comorbidades<sup>(36, 41, 71)</sup>. Essa elevação tênue de Tn pode refletir uma injúria miocárdica inexpressiva, que não resulta em disfunção miocárdica. O uso da estratégia de múltiplos biomarcadores como BNP, Gal-3 e MPO associados à Tn pode ser capaz de refinar e aumentar a sensibilidade na detecção da cardiotoxicidade futura. Mas, assim como ocorreu com a troponina, uma injúria miocárdica discreta pode tornar essa estratégia ineficaz.

Em nosso estudo, a tentativa de refinar a detecção de CTX com múltiplos biomarcadores não foi eficaz. Mas, foi demonstrada uma maior magnitude de injúria miocárdica, quando selecionamos os pacientes que apresentaram MPO basal acima da média e, por conseguinte, uma melhor resposta ao carvedilol. Esta relação entre troponina, MPO basal e resposta a carvedilol contribui para reafirmar o papel do stress oxidativo, como mecanismo central na cardiotoxicidade induzida por antraciclina e ratifica o papel de MPO, como biomarcador de cardiotoxicidade, com a capacidade de aumentar o valor preditivo da troponina. Este resultado é corroborado por estudos prévios que avaliaram múltiplos biomarcadores neste contexto e destacaram a MPO, como o único biomarcador a aumentar o valor preditivo da troponina a curto e longo prazos <sup>(55, 56)</sup>. Deve-se destacar que este foi o único estudo que avaliou o comportamento destes dois biomarcadores com quimioterapia exclusiva por antracíclicos, tornando ainda mais evidente a correlação entre ANT, MPO e injúria miocárdica. Além disso, os efeitos antioxidantes de carvedilol podem justificar o efeito protetor do mesmo na injúria miocárdica secundária à ANT apresentada neste estudo, pois foi evidenciada uma menor elevação de troponina com seu uso justamente no grupo com MPO basal acima da média, ou seja, em pacientes com maior stress oxidativo. Esta correlação estabelecida entre MPO elevada e melhor resposta a carvedilol pode ajudar a selecionar os pacientes mais vulneráveis a desenvolver CTX e talvez, contribuir para que carvedilol estabeleça definitivamente seu papel na terapia de prevenção primária.

Este estudo apresenta algumas limitações. Foram excluídos 18 pacientes da amostragem original em razão da presença de amostras hemolisadas, além de tratar-se de análise *post hoc*. Nosso principal achado é baseado em uma divisão randômica dos biomarcadores entre abaixo e acima da média, porém é importante ressaltar que não há valores basais de referência para MPO e Gal-3, e que esta divisão foi similar a apresentada em estudos anteriores <sup>(52, 55, 56)</sup>. Teoricamente, pacientes com câncer de mama são mais inflamados em razão da doença de base e teriam um maior valor basal da MPO. Entretanto, em nosso estudo, os valores basais da MPO foram menores do que a média de uma população saudável <sup>(81)</sup>, além de ser o único estudo da literatura que realizou ao menos duas medidas da MPO em momentos distintos do tratamento com ANT. Pela baixa incidência de CTX no estudo CECCY, a presente análise estatística pode estar subestimada, embora seja derivada do maior estudo prospectivo, duplo-cego, randomizado e placebo-controlado sobre o uso de drogas cardiovasculares para prevenção primária de CTX induzida por ANT.

Como os biomarcadores são a alteração mais prematura da injúria miocárdica após quimioterapia com ANT e, até o momento, nenhum biomarcador isolado foi capaz de prever a disfunção ventricular esquerda, a combinação de múltiplos biomarcadores pode aumentar a sensibilidade e a acurácia em identificar CTX. Neste estudo, MPO demonstrou aumentar a acurácia da Tnl e permitiu identificar aqueles que mais poderiam se beneficiar do carvedilol como prevenção primária. Desta forma, novos estudos são necessários para estabelecer o papel da MPO na estratificação

de CTX e, com isso, identificar os pacientes que mais se beneficiariam da terapia de prevenção primária com carvedilol.

## **7 Conclusão**

---



## 7 CONCLUSÃO

Nesta subanálise do estudo CECCY, concluímos que os biomarcadores mieloperoxidase e galectina-3 não se correlacionaram com o desenvolvimento de cardiotoxicidade. Embora ambos os biomarcadores tenham apresentado elevação ao longo da terapia com antraciclina, não houve relação desta elevação com alteração de troponina e tampouco houve impacto no nível sérico dos biomarcadores com o uso do betabloqueador carvedilol. No entanto, em uma análise exploratória, estabeleu-se relação entre os níveis séricos de mieloperoxidase basal acima da média com maior elevação de troponina e, conseqüentemente, melhor resposta a carvedilol.

## **8 Anexos**

---

## 8 ANEXOS

### Anexo 1 – TCLE

1

#### HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

##### DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .....
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : M  F
- DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
- ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
- BAIRRO: ..... CIDADE: .....
- CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....) .....
2. RESPONSÁVEL LEGAL .....
- NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE : ..... SEXO: M  F
- DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
- ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....
- BAIRRO: ..... CIDADE: .....
- CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....) .....

##### DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA **Estudo Duplo-cego Randomizado e Controlado sobre o Efeito do Betabloqueador na Prevenção do Desenvolvimento de Cardiomiopatia Secundária a Quimioterápicos**
- PESQUISADOR : **Silvia Moreira Ayub Ferreira**
- CARGO/FUNÇÃO: **médico-assistente** INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº **75810**
- UNIDADE DO HCFMUSP: **Instituto do Coarção do HC-FMUSP**
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
- RISCO MÍNIMO  RISCO MÉDIO
- RISCO BAIXO  RISCO MAIOR
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 5 ANOS

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável \_\_\_\_\_

Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

1 –O objetivo deste estudo é verificar se o uso de uma medicação da classe dos betabloqueadores cujo nome é CARVEDILOL pode prevenir o aparecimento de disfunção no coração provocada pelo uso de medicação quimioterápica. Esta disfunção no coração recebe o nome de CARDIOPATIA SECUNDÁRIA AO USO DE QUIMIOTERÁPICOS e aparece em 23% dos pacientes que são tratados com quimioterápicos do grupo da ANTRACICLINA. Alguns estudos iniciais sugerem que o uso deste medicamento, o CARVEDILOL, ajuda a prevenir esta cardiopatia, porém estudos com um número maior de pacientes é necessário para confirmar estes resultados. Para se estudar o efeito deste medicamento temos que comparar um grupo que irá receber o CARVEDILOL com um grupo que não. Este segundo grupo irá receber um comprimido placebo (sem conter o princípio ativo do carvedilol).

2 – Durante este protocolo de pesquisa o senhor (a) será sorteado para receber o medicamento CARVEDILOL ou PLACEBO (comprimido inerte) durante 24 semanas (1 comprimido a cada 12 horas). Será submetido à coleta de exames de sangue (no início do estudo, 3, 6, 9, 12 e 24 semanas) para realização de dosagem de substâncias (troponina ultra-sensível, microRNA-208a e BNP) que nos fornecem informações sobre a possível lesão do coração pela medicação quimioterápica. O (a) senhor(a) também realizará ecocardiograma, que é um ultra-som do coração, no início do estudo, 6, 12, 24, 48 e 96 semanas. Estes exames nos fornecem informações muito importantes sobre o funcionamento do seu coração.

3 – O senhor (a) terá como desconfortos esperados pelo estudo: o uso do CARVEDILOL pode acarretar a queda da pressão arterial e o batimento lento do coração; estes efeitos serão minimizados porque o paciente será avaliado pelo médico cardiologista antes da introdução do medicamento e semanalmente até alcançarmos a dose alvo; outro desconforto esperado é a punção da sua veia para coleta de exames de sangue; na realização do ecocardiograma o senhor permanecerá por tempo prolongado (30 minutos) em posição que poderá ser desconfortável (deitado do lado esquerdo).

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável\_\_\_\_\_

Rubrica do pesquisador\_\_\_\_\_

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

4 – Os seus benefícios de participar deste protocolo serão a avaliação detalhada da função do seu coração e a oportunidade de ter um acompanhamento contínuo com cardiologista da evolução da função do seu coração. Caso seja detectado durante o seguimento disfunção do coração o senhor será encaminhado para acompanhamento gratuito no Instituto do Coração na Unidade de Insuficiência Cardíaca e Transplante Cardíaco.

5 - Em qualquer etapa do estudo, o senhor (a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dr Edimar Alcides Bocchi, que pode ser encontrada no endereço: Instituto do Coração (Incor), Unidade de Insuficiência Cardíaca e Transplante Cardíaco, Rua Enéas de Carvalho Aguiar, 44, Bloco II, AB Andar, Unidade de Insuficiência Cardíaca, Telefone 2661-5419 ou 99801-6432. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 2661-6442 ramal 26 – e-mail: [cappesq@hcnet.usp.br](mailto:cappesq@hcnet.usp.br);

6 - O senhor tem garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento, podendo deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

7 – As informações a respeito do senhor (a) obtidas durante este estudo serão analisadas em conjunto com as de outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;

8 - O Senhor (a) tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas;

9 - Não há despesas pessoais para o senhor (a) em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

10 - Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas

11 - O senhor (a) tem o nosso compromisso de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável \_\_\_\_\_

Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_



## Anexo 2 - Apresentação do trabalho no congresso da American Heart Association. 10-12 novembro em Chicago -IL

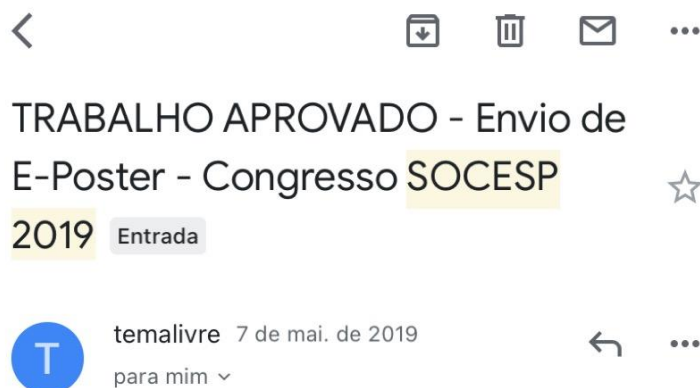


### Plasma Biomarkers Reflecting High Oxidative Stress Predicts Myocardial Injury Related to Anthracycline Chemotherapy

Mauro Rogério de Barros Wanderley Jr, Mônica Samuel Avila, Miguel Morita Fernandes-Silva, Edimar Alcides Bocchi and Sílvia Moreira Ayub-Ferreira.  
On behalf of all CEECY Trial Investigators

ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01724450  
No disclosures to declare for this presentation



**Anexo 3 – Apresentação do trabalho no Congresso da Socesp 2019**

**ATENÇÃO: DATA LIMITE PARA ENVIO DO ARQUIVO DO E-PÔSTER - 30/Maio/2019**

Prezado(a) Dr. (a) **Mauro Rogério de Barros Wanderley Jr**

[maurowanderley@gmail.com](mailto:maurowanderley@gmail.com)

Temos a satisfação de informar que a Comissão de Tema Livre do **40º Congresso da SOCESP APROVOU** seu resumo intitulado:

**Avaliação de Biomarcadores de Estresse Oxidativo na Cardiotoxicidade Relacionada a Quimioterápicos,**

para ser apresentado no formato **E-PÔSTER**, conforme indicado abaixo:

DATA DA APRESENTAÇÃO: **21/06/2019**

HORÁRIO DE APRESENTAÇÃO: ~~10:30:00~~ às **11:30:00**



## Anexo 4 – Apresentação trabalho no Congresso DEIC 2019



Certificamos que o trabalho

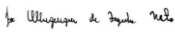
*Avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo na cardiotoxicidade relacionada a quimioterápicos*

dos autores

MAURO ROGERIO DE BARROS WANDERLEY JUNIOR, MONICA SAMUEL AVILA, MIGUEL MORTTA FERNANDES DA SILVA, FÁTIMA DAS DORES CRUZ, SARA MICHELLY GONÇALVES BRANDÃO, VAGNER OLIVEIRA CARVALHO RIGAUD, EDECIO C NETO, LUDHMILA ABRAHÃO HAJAR, ROBERTO KALIL FILHO, EDIMAR ALCIDES BOCCHI, SILVIA MOREIRA AYUB FERREIRA foi apresentado como PÔSTER no XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA – DEIC 2019 no período de 08 a 10 de agosto de 2019, no Centro de Convenções do Ceará, Fortaleza - CE.

  
João David de Souza Neto  
Presidente do DEIC 2019

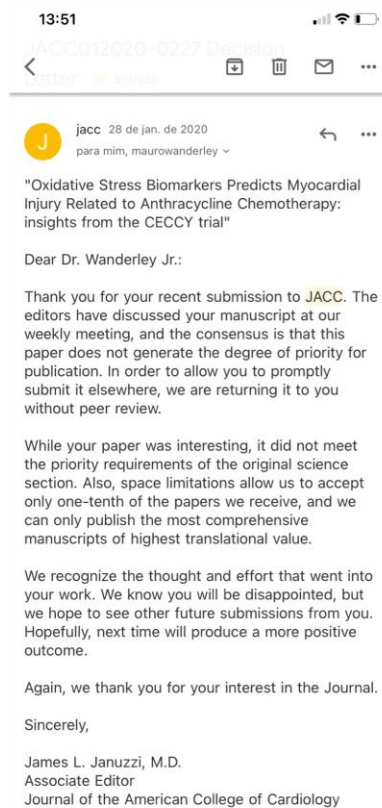
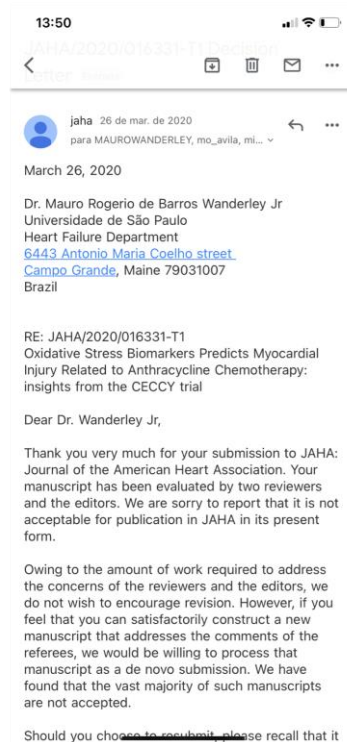
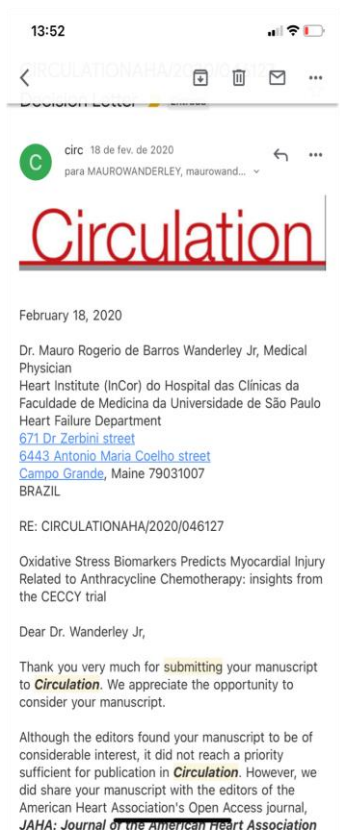
  
Odilson Marcos Silvestre  
Coordenador de Temas Livres  
DEIC 2019

  
José Albuquerque de Figueiredo Neto  
Coordenador de Temas Livres  
DEIC 2019

  
Sílvia Marinho Martins  
Coordenadora de Temas Livres  
DEIC 2019



## Anexo 4 – Submissão



## Anexo 5 – Artigo original do estudo principal publicado no *Journal of American College Cardiology*

JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY  
© 2018 BY THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY FOUNDATION  
PUBLISHED BY ELSEVIER

VOL. 71, NO. 20, 2018

### ORIGINAL INVESTIGATIONS

## Carvedilol for Prevention of Chemotherapy-Related Cardiotoxicity



### The CECCY Trial

Mônica Samuel Avila, MD,<sup>1,\*</sup> Sílvia Moreira Ayub-Ferreira, MD, PhD,<sup>1,\*</sup> Mauro Rogerio de Barros Wanderley, Jr, MD,<sup>1</sup> Fatima das Dores Cruz, RN,<sup>2</sup> Sara Michelly Gonçalves Brandão, RN,<sup>3</sup> Vagner Oliveira Carvalho Rigaud, PhD,<sup>4</sup> Marília Harumi Higuchi-dos-Santos, MD, PhD,<sup>5</sup> Ludhmila Abrahão Hajjar, MD, PhD,<sup>6,7</sup> Roberto Kalil Filho, MD, PhD,<sup>6,7</sup> Paulo Marcelo Hoff, MD, PhD,<sup>8</sup> Marina Sahade, MD,<sup>9</sup> Marcela S.M. Ferrari, MD,<sup>9</sup> Romulo Leopoldo de Paula Costa, MD,<sup>9</sup> Max Senna Mano, MD, PhD,<sup>9</sup> Cecília Beatriz Bittencourt Viana Cruz, MD,<sup>6,7</sup> Maria Cristina Abduch, VMD,<sup>6</sup> Marco Stephan Loffano Alves, MD, PhD,<sup>6</sup> Guilherme Veiga Guimaraes, PhD,<sup>8</sup> Victor Sarli Issa, MD, PhD,<sup>8</sup> Marcio Sommer Bittencourt, MD, MPH, PhD,<sup>6,7,8</sup> Edimar Alcides Bocchi, MD, PhD<sup>8</sup>

#### ABSTRACT

**BACKGROUND** Anthracycline (ANT) chemotherapy is associated with cardiotoxicity. Prevention with  $\beta$ -blockers remains controversial.

**OBJECTIVES** This prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study sought to evaluate the role of carvedilol in preventing ANT cardiotoxicity.

**METHODS** The authors randomized 200 patients with HER2-negative breast cancer tumor status and normal left ventricular ejection fraction (LVEF) referred for ANT (240 mg/m<sup>2</sup>) to receive carvedilol or placebo until chemotherapy completion. The primary endpoint was prevention of a  $\geq 10\%$  reduction in LVEF at 6 months. Secondary outcomes were effects of carvedilol on troponin I, B-type natriuretic peptide, and diastolic dysfunction.

**RESULTS** Primary endpoint occurred in 14 patients (14.5%) in the carvedilol group and 13 patients (13.5%) in the placebo group ( $p = 1.0$ ). No differences in changes of LVEF or B-type natriuretic peptide were noted between groups. A significant difference existed between groups in troponin I levels over time, with lower levels in the carvedilol group ( $p = 0.003$ ). Additionally, a lower incidence of diastolic dysfunction was noted in the carvedilol group ( $p = 0.039$ ). A nonsignificant trend toward a less-pronounced increase in LV end-diastolic diameter during the follow-up was noted in the carvedilol group ( $44.1 \pm 3.64$  mm to  $45.2 \pm 3.2$  mm vs.  $44.9 \pm 3.6$  mm to  $46.4 \pm 4.0$  mm;  $p = 0.057$ ).

**CONCLUSIONS** In this largest clinical trial of  $\beta$ -blockers for prevention of cardiotoxicity under contemporary ANT dosage, the authors noted a 13.5% to 14.5% incidence of cardiotoxicity. In this scenario, carvedilol had no impact on the incidence of early onset of LVEF reduction. However, the use of carvedilol resulted in a significant reduction in troponin levels and diastolic dysfunction. (Carvedilol Effect in Preventing Chemotherapy-Induced Cardiotoxicity [CECCY]; NCT01724450) (J Am Coll Cardiol 2018;71:2281-90) © 2018 by the American College of Cardiology Foundation.



Listen to this manuscript's audio summary by JACC Editor-in-Chief Dr. Valentin Fuster.



From the <sup>1</sup>Heart Failure Department, Heart Institute (InCor) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; <sup>2</sup>Heart Institute (InCor) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; <sup>3</sup>Instituto do Câncer do Estado de São Paulo-Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; and the <sup>4</sup>Center for Clinical and Epidemiological Research, University Hospital, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. \*Drs. Avila and Ayub-Ferreira contributed equally to this article and are joint first authors. This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2010/18078-8) as part of Mônica Samuel Avila's doctoral thesis under the guidance of Sílvia Moreira Ayub-Ferreira. Baldacci Laboratories donated the carvedilol and placebo used in this study. The Baldacci Laboratories did not participate in any phase of the study. Dr. Issa has received speaking honoraria from Novartis. Dr. M. Bittencourt has received unrestricted funding support from Sanofi; and speaking honoraria from Boston Scientific. Dr. Bocchi has received

ISSN 0735-1097/\$36.00

<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.02.049>

**ABBREVIATIONS  
AND ACRONYMS**

**ANT** = anthracycline  
**BNP** = B-type natriuretic peptide  
**HF** = heart failure  
**ln** = natural logarithm  
**LV** = left ventricular/ventricle  
**LVEF** = left ventricular ejection fraction  
**Tnl** = troponin I

**D**espite advances in the survival of patients with cancer, their prognosis remains limited by complications that are frequently treatment related (1). Cardiovascular effects of chemotherapeutic agents are responsible for a significant proportion of severe complications, particularly among female patients with breast cancer (2). One of the most widely used agents (3,4), anthracyclines (ANT), is responsible for early and late dose-related cardiotoxicity, particularly overt heart failure (HF) (5-7).

Several primary and secondary prevention strategies have been proposed to reduce ANT-induced cardiotoxicity (8). These strategies extrapolate guideline-oriented therapies for HF to patients with chemotherapy-induced cardiomyopathy. This includes the use of  $\beta$ -blockers as a mainstay HF treatment based on their beneficial effects on neurohumoral activation, symptoms, and prognosis (9,10). In nonrandomized studies of secondary prevention of cardiotoxicity with enalapril and carvedilol, recovery of left ventricular ejection fraction (LVEF) was reported with early treatment after initial clinical presentation (11,12). Therefore, an earlier approach could determine greater success in the management of cardiotoxicity.

SEE PAGE 2291

However, the use of  $\beta$ -blockers for primary prevention of cardiotoxicity remains controversial. Previous trials supporting  $\beta$ -blocker use have many design limitations, such as being observational, open-label, single-blind, combined cardiovascular drugs, or limited number of patients (13-16). On the contrary, in the recent PRADA (Prevention of Cardiac Dysfunction During Adjuvant Breast Cancer Therapy) trial, metoprolol succinate was not associated with a reduction in the incidence of cardiotoxicity (17). However, carvedilol and metoprolol succinate have distinct pharmacologic properties (18,19).

In the face of controversial evidence supporting the use of  $\beta$ -blockers for primary prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity (7,8,20), we conducted the CECCY (Carvedilol Effect in Preventing Chemotherapy-Induced Cardiotoxicity) trial, the aim of which was to test the effects of carvedilol for primary prevention of cardiotoxicity.

**METHODS**

**STUDY DESIGN.** The CECCY trial was a prospective, double-blind, randomized, placebo-controlled study conducted in the Heart Failure Department of Heart Institute (InCor) and the Cancer Institute, São Paulo, Brazil. Patients were referred from the Cancer Institute, and the Heart Failure Team of the Heart Institute was responsible for allocation, randomization, and optimization of the dose of carvedilol/placebo. Data were collected, managed, and analyzed by the Heart Failure Team after the end of the study.

The institutional review board at both institutions approved the trial protocol (Figure 1). All participants were informed about the research objectives, research protocol, and treatment alternatives involved in the study, and all participants provided written informed consent to participate in the study. The trial was registered at the ClinicalTrials.gov (NCT01724450) before study initiation.

**STUDY PATIENTS.** We included all consecutive patients with HER2-negative breast cancer tumor status and therapy that included anthracycline, cyclophosphamide, and taxane from April 23, 2013 to January 3, 2017. The standard chemotherapy protocol comprised 4 cycles of cyclophosphamide 600 mg/m<sup>2</sup> and doxorubicin 60 mg/m<sup>2</sup> every 21 days (with a total cumulative dose of 240 mg/m<sup>2</sup>), followed by paclitaxel 80 mg/m<sup>2</sup> weekly for 8 weeks.

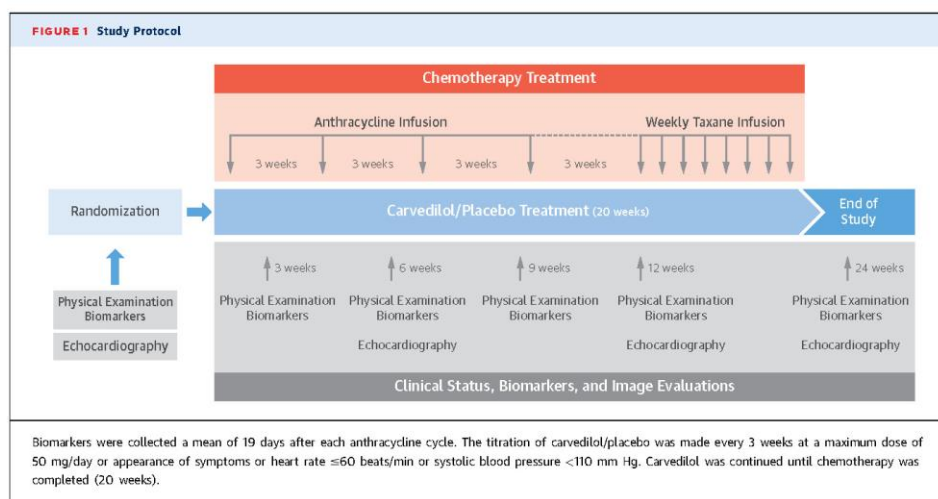
Eligibility requirements included an age of at least 18 years, diagnosis of invasive breast adenocarcinoma, with an indication for adjuvant or neoadjuvant therapy.

Exclusion criteria included the impossibility of left ventricular (LV) function evaluation; prior history of chemotherapy or radiation; HF symptoms; prior diagnosis of cardiomyopathy, coronary artery disease, moderate to severe mitral and aortic disease; use of angiotensin-converting enzyme inhibitors, angiotensin receptor blockers, or  $\beta$ -blockers; contraindication to the use of  $\beta$ -blockers; and patients with HER2 expression.

**RANDOMIZATION, ALLOCATION, AND INTERVENTION.** Randomization was on a 1:1 ratio to receive carvedilol or placebo. The randomization included a pre-defined stratification according to menopause status

consulting fees from Servier and AstraZeneca; subsidized travel/hotel/registration fees and other honoraria from Servier; serves on steering committees for Servier and Novartis; and is a contracted researcher for Jansen and Bayer/Merck. All other authors have reported that they have no relationships relevant to the contents of this paper to disclose.

Manuscript received February 16, 2018; revised manuscript received February 28, 2018, accepted February 28, 2018.



considering the potential difference in cardiotoxicity risk between pre- and post-menopause (21). The randomization was performed with a computer-based randomization list in blocks of 4, including 2 carvedilol and 2 placebos. Data on randomization and allocation were maintained in the custody of an independent research pharmacy at the Cancer Institute.

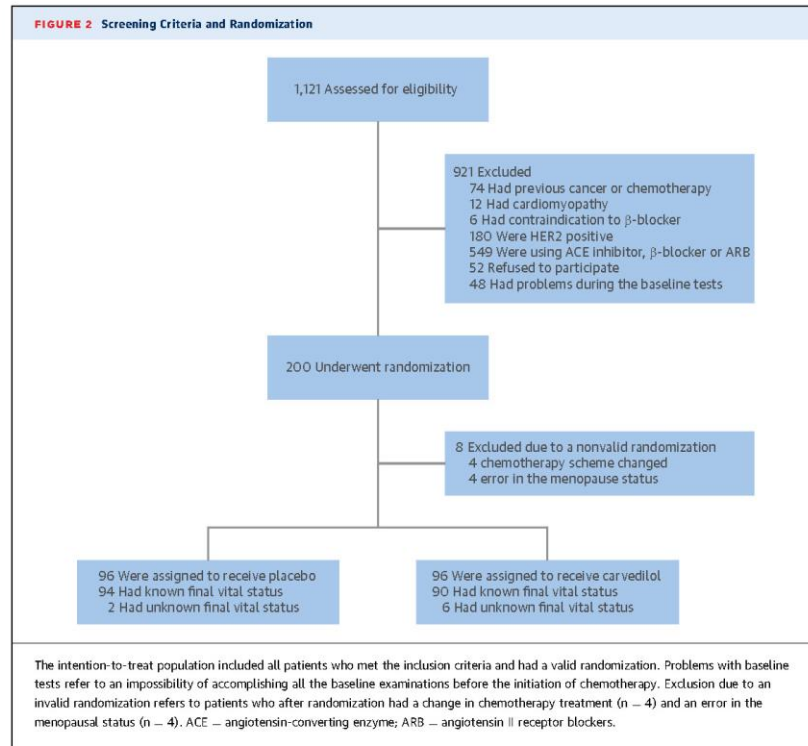
Carvedilol and placebo were administered in a progressive manner with incremental dosing at 3-week intervals beginning with a dose of 3.125 mg twice a day, which was then increased to 6.25 mg, then to 12.5 mg, to a maximum dose of 25 mg every 12 h or until the appearance of intolerable symptoms or heart rate  $\leq 60$  beats/min or systolic blood pressure  $< 110$  mm Hg. Carvedilol and placebo were continued until completion of chemotherapy.

**STUDY PROCEDURES.** All eligible patients underwent a baseline transthoracic echocardiogram and routine laboratory tests including biomarkers before randomization. If the patient met the eligibility criteria, the randomization was performed. After randomization, the medication was initiated on the first day of chemotherapy. The following sequential measurements of biomarkers were performed in a median of 19 days after each ANT cycle. The echocardiography, troponin I (TnI), and B-type natriuretic peptide (BNP) follow-up evaluations are summarized in Figure 1.

The quantitative TnI determination was obtained by means of a 3-step sandwich immunoassay using

direct chemiluminescent technology and constant amounts of 2 monoclonal antibodies. An auxiliary reagent is included to reduce nonspecific binding using the ADVIA Centaur TnI-Ultra commercial kit (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, New York). The level of detection was 0.006 ng/ml. Levels  $< 0.006$  were reported as 0.005 ng/ml. The normal range of TnI was  $< 0.04$  ng/ml. Plasma concentration of BNP was obtained with a 2-step sandwich immunoassay using direct chemiluminescent technology and constant amounts of 2 monoclonal antibodies using the commercial kit ADVIA Centaur (Siemens Healthcare, Malvern, Pennsylvania). The results are presented in pg/ml. The level of detection was 2 pg/ml. Levels  $< 2$  are reported as 1 pg/ml.

Transthoracic echocardiography was performed with a commercially available system (Envisor Philips, Philips Healthcare, Andover, Massachusetts). All the measurements were performed and reported according to the recommendations of the American Society of Echocardiography (22). LVEF was measured by Simpson rule, throughout apical 4- and 2-chamber views. We also assessed the following echocardiographic parameters: left atrium diameter, interventricular septum diameter, posterior wall thickness, LV end-diastolic diameter, LV end-systolic diameter, and mitral inflow with the use of Doppler echocardiography (23). Diastolic function was evaluated by mitral inflow E/A pattern, E/A ratio, E velocity deceleration time, annular tissue Doppler



curves (e'/a'), and E/e' ratio (22). All echocardiography data was stored including the original DICOM (Digital Imaging and Communications in Medicine) images. These images were stored on a secure institutional drive. All scans were read by experienced board-certified echocardiographers who were blinded to all clinical characteristics.

**STUDY ENDPOINTS.** The primary endpoint was an early onset drop in LVEF of at least 10% from baseline until the end of chemotherapy at 6 months (24). The secondary endpoints were changes in the levels of TnI (TnI >0.04 ng/ml), BNP, and in diastolic dysfunction recommended by guidelines at the time of the study design (23).

**STATISTICAL ANALYSIS.** The sample size was calculated with an expected incidence of cardiotoxicity of 23% with the use of ANT and an expected reduction to 8% with the addition of β-blockers (15).

We estimated a loss of follow-up of 5%, statistical significance level of 95%, and 80% power.

Quantitative variables are expressed as mean ± SD when normally distributed or as median (interquartile range) if the hypothesis of normality was rejected. For troponins and BNP levels, we performed a natural logarithm (ln) transformation to normalize the data. Categorical variables were compared using the Fisher exact test, including the comparison of the prevalence of LV dysfunction at the end of chemotherapy and occurrence of side effects. For the clinical outcomes, we performed a log-rank test to compare the incidence of events across groups.

For the longitudinal analysis of the echocardiography parameters, ln-transformed troponins, and BNP, we plotted the mean and 95% confidence intervals stratified by treatment group on linear graphs. We then constructed longitudinal linear mixed-effects models to compare the 2 treatment groups.

For the longitudinal mixed models, we constructed models including the interaction of time and treatment group with a fixed intercept, assuming baseline measurements of each predictor were similar across groups due to the randomized design of the study. The difference between groups was considered significant if the interaction term between group and time was significant. Due to the previously known nonlinearity of the evolution of troponin over time after ANT use, which was also seen in our data, we pre-specified an additional model for the evaluation of ln-transformed troponin levels across time. In this model, time was included as a quadratic function by the inclusion of first- and second-order time variables to accommodate the biphasic behavior of the troponin levels in each group. Then, we evaluated the interaction of time and time squared with the treatment group to assess the longitudinal differences in the distribution of the ln troponin over time. Additionally, to provide a single overall level of significance for the difference in the TnI levels between the 2 groups, we then constructed a model without interaction terms and compared it with a model including both interaction terms using a likelihood ratio test as 1 model was nested into the other. For the longitudinal analysis of diastolic dysfunction, we have used generalized estimating equations using the logit function, as the outcome was binary. For the analysis of the difference in prevalence of diastolic dysfunction, an interaction term of treatment group and medication was created, and the analysis was performed with the same strategy described for the longitudinal mixed-effects models used for the continuous variables. The statistical analysis was performed using Stata version 14.0 (StataCorp, College Station, Texas) and the level of significance was defined as  $p < 0.05$ .

## RESULTS

From April 2013 to January 2017, we screened 1,122 consecutive patients with breast cancer referred for ANT chemotherapy (Figure 2). We randomized 200 patients; 8 of them had no valid randomization. The reasons for an invalid randomization were change in chemotherapy scheme ( $n = 4$ ) and error in the information about menopausal status ( $n = 4$ ). Thus, 192 patients were randomly assigned to receive carvedilol or placebo for the intention-to-treat analysis. The baseline characteristics of the patients were statistically balanced across groups (Table 1). Online Table 1 demonstrates the percentage of patients at the different dose ranges of carvedilol or placebo. Also, the mean serum creatinine levels were also

	Carvedilol (n = 96)	Placebo (n = 96)	p Value
Age, yrs	50.80 ± 10.10	52.90 ± 9.05	0.14
Menopause			0.88
Pre-menopause	49 (51.0)	48 (50.0)	
Post-menopause	47 (49.0)	48 (50.0)	
Therapy			0.054
Neoadjuvant	56 (58.3)	42 (43.7)	
Adjuvant	40 (41.6)	52 (54.1)	
Palliative	0 (0.0)	2 (2.0)	
Maximal tolerated carvedilol/placebo dose, mg/day	18.50 ± 17.60	22.20 ± 15.57	0.078
Body mass index, kg/m <sup>2</sup>	27.28 ± 5.04	27.48 ± 5.79	0.76
Cardiovascular risk factors			
Hypertension	3 (3.1)	9 (9.3)	0.13
Diabetes mellitus	4 (4.1)	5 (5.2)	1.0
Hypercholesterolemia under statin treatment	6 (6.2)	2 (2.0)	0.54
Current/past smokers	24 (25.0)	26 (27.0)	0.87
Systolic blood pressure, mm Hg	120.3 ± 16.6	124.8 ± 17.2	0.07
Diastolic blood pressure, mm Hg	77.9 ± 11.9	78.4 ± 10.2	0.73
Heart rate, beats/min	80.0 ± 14.1	82.4 ± 12.6	0.21
Serum troponin I baseline, ng/ml	0.005 (0.005-0.005)	0.005 (0.005-0.005)	0.99
Serum BNP, pg/ml	16.00 (8.25-25.00)	12.00 (6.00-21.00)	0.55

Values are mean ± SD, n (%), or median (interquartile range).  
BNP = B-type natriuretic peptide.

balance between groups,  $0.70 \pm 0.12$  mg/dl in carvedilol group and  $0.723 \pm 0.13$  mg/dl.

**PRIMARY ENDPOINT.** During the follow-up, 27 patients (14.0%) had a decrease of at least 10% in LVEF at 6 months after the initiation of chemotherapy. Of these patients, 14 (14.5%) were in the carvedilol group and 13 (13.5%) were in the placebo group ( $p = 1.0$ ). In an exploratory manner, considering an alternative definition of cardiotoxicity as a decrease of 10 percentage points to a value below the lower normal value of 55% in our center (25), only 1 patient (1%) in the placebo group and none in the carvedilol group fulfilled criteria for cardiotoxicity and had a decrease of LVEF to 35% (Table 2).

The mean baseline LVEF was  $65.2 \pm 3.6\%$  in the placebo group and  $64.8 \pm 4.7\%$  in the carvedilol group. After 6 months of chemotherapy, LVEF was  $63.9 \pm 5.2\%$  in the placebo group and  $63.9 \pm 3.8\%$  in the carvedilol group (Table 2), a nonsignificant absolute LVEF reduction of 1.3% in the placebo group and 0.9% in the carvedilol group. No changes in LVEF from baseline throughout the 6 months were noted between groups ( $p = 0.84$ ) (Figure 3A).

Taking into account menopausal status, no difference was seen between carvedilol and placebo in both subgroups pre- and post-menopause.

TABLE 2 Primary and Secondary Endpoints			
	Placebo (n = 96)	Carvedilol (n = 96)	p Value
<b>Primary endpoints</b>			
Patients with decrease in LVEF >10%	13 (13.5)	14 (14.5)	1.00
Sequential LVEF, %			0.84
Baseline	65.2 ± 3.6	64.8 ± 4.7	
6 weeks	64.5 ± 3.6	64.2 ± 8.0	
12 weeks	64.6 ± 4.0	64.0 ± 3.9	
24 weeks	63.9 ± 5.2	63.9 ± 3.8	
<b>Secondary endpoints</b>			
<b>Biomarkers</b>			
<b>Troponin I</b>			
Troponin I—patients with values ≥0.04 ng/ml	40 (41.6)	25 (26.0)	0.003
Sequential troponin, ng/ml			0.003*
Baseline	0.005 (0.005-0.005)	0.005 (0.005-0.005)	
3 weeks	0.001 (0.000-0.010)	0.006 (0.000-0.011)	
6 weeks	0.006 (0.000-0.013)	0.006 (0.000-0.010)	
9 weeks	0.015 (0.008-0.030)	0.014 (0.006-0.019)	
12 weeks	0.037 (0.022-0.058)	0.026 (0.017-0.044)	
24 weeks	0.010 (0.000-0.024)	0.016 (0.007-0.028)	
Sequential BNP, pg/ml			0.85†
Baseline	12.00 (6.00-21.00)	16.00 (8.25-25.00)	
3 weeks	13.00 (7.50-22.00)	17.00 (10.00-28.00)	
6 weeks	12.00 (6.00-22.00)	17.00 (9.00-27.00)	
9 weeks	14.00 (5.00-26.00)	18.00 (8.75-33.25)	
12 weeks	11.00 (6.00-23.00)	17.00 (9.50-31.00)	
24 weeks	10.00 (6.00-23.00)	13.00 (7.00-20.00)	
<b>Abnormal echo diastolic function—patients‡</b>			
Baseline	14 (15.2)	21 (21.8)	0.039
24 weeks	32 (37.2)	24 (28.5)	

Values are n (%), mean ± SD, or median (interquartile range). \*Linear mixed-effects model with time modeled as a quadratic function (p = 0.003 for the likelihood ratio between nested models). †Linear mixed-effects model. ‡Total number of patients in placebo group: 86; total number of patients in carvedilol group: 84 (missing data due to technical limitations for echocardiograms after breast cancer surgery, missing patients, or death).  
BNP = brain natriuretic peptide; Echo = echocardiogram; LVEF = left ventricular ejection fraction.

**ECHOCARDIOGRAM MEASUREMENTS.** During the follow-up, a trend toward a less-pronounced increase in LV end-diastolic diameter was noted in the carvedilol group compared with placebo (from 44.1 ± 3.3 mm to 45.2 ± 3.2 mm vs. from 44.9 ± 3.6 mm to 46.4 ± 4.0 mm, respectively; p = 0.057) (Figure 3B). No differences across groups in left atrium septal or posterior wall or LV end-systolic diameter were noted over time (Online Tables 2 to 7).

**SECONDARY ENDPOINTS.** TnI levels increased from baseline until the end of the study in both groups (Table 2). However, this increase of TnI levels over time was attenuated in the carvedilol arm (p = 0.003) (Central Illustration). Sixty-five patients (33.8%) had plasma levels of TnI >0.04 ng/ml. Of these, 25 (26.0%) were in the carvedilol and 40 (41.6%) were in the placebo group (p = 0.03) (Table 2, Online Figure 1).

After the end of ANT cycles, a drop occurred in TnI levels in both groups (Central Illustration). For BNP, however, no difference occurred across groups over the course of follow-up (p = 0.85) (Table 2).

We found a lower incidence of diastolic dysfunction in the carvedilol compared with the placebo group (p = 0.039) (Table 2). The incidence of diastolic dysfunction in the placebo group increased progressively during ANT treatment, but not in the carvedilol group (Online Figure 2). The majority (91%) of diagnosed diastolic dysfunction cases were classified as diastolic dysfunction grade 1, relaxation abnormality.

**CLINICAL EVENTS.** No differences were found in the incidence of clinical events across groups. Two deaths (2.1%) occurred in the placebo and 2 (2.1%) in the carvedilol group (p = 1.00), all due to cancer progression. In the placebo group, we observed 1 case of de novo HF and 1 case of asymptomatic atrial flutter with normal LVEF. A detailed description of all clinical events is presented in Online Table 7.

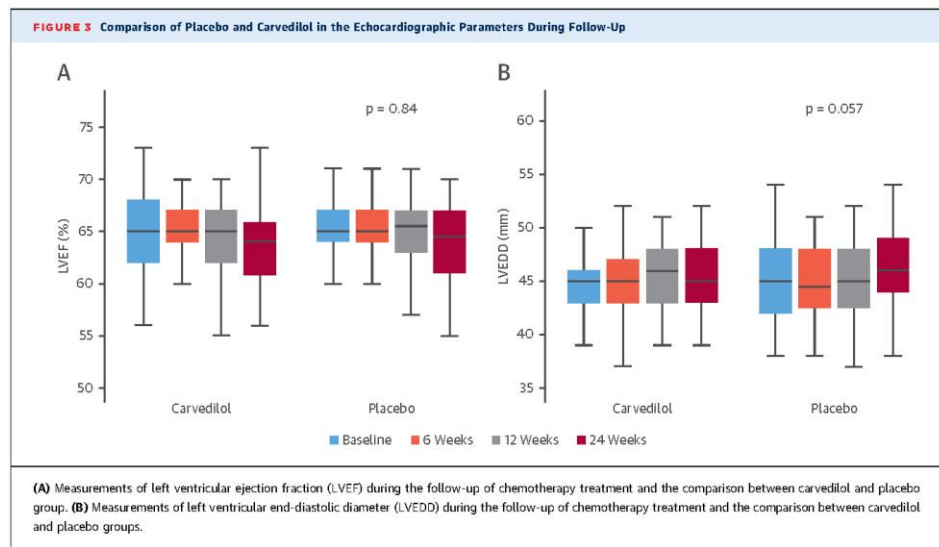
A significant difference occurred in both systolic and diastolic blood pressure in the carvedilol compared with the placebo group at 12 and 24 weeks (Online Figures 3 and 4). Similarly, heart rate in the carvedilol group was lower than that in the placebo group from 6 weeks up to 24 weeks (Online Figure 5).

No differences occurred in the incidence of side effects or carvedilol/placebo discontinuation across groups. The most common adverse event in the placebo group was dizziness and in the carvedilol group symptomatic hypotension (Online Table 8). No serious adverse events occurred, and carvedilol was well tolerated. Nine patients stopped the drug due to side effects, 6 (6.2%) in the placebo group and 3 (3.1%) in the carvedilol group (p = 0.30).

## DISCUSSION

To the best of our knowledge, the CECCY trial is the largest prospective randomized double-blind trial evaluating the use of cardiovascular drugs for primary prevention of ANT cardiotoxicity. In patients receiving contemporary doses of ANT, a low prevalence of cardiovascular comorbidities and risk factors for cardiotoxicity, a small percentage of patients experienced an early onset reduction in LVEF, which was not influenced by the use of carvedilol. Nevertheless, carvedilol was associated with attenuated peak levels of TnI and a lower percentage of patients experiencing increases in serum TnI levels. Also, its use was associated with a trend toward a less pronounced increase in LV diastolic diameter and a reduction in the percentage of patients with diastolic dysfunction.



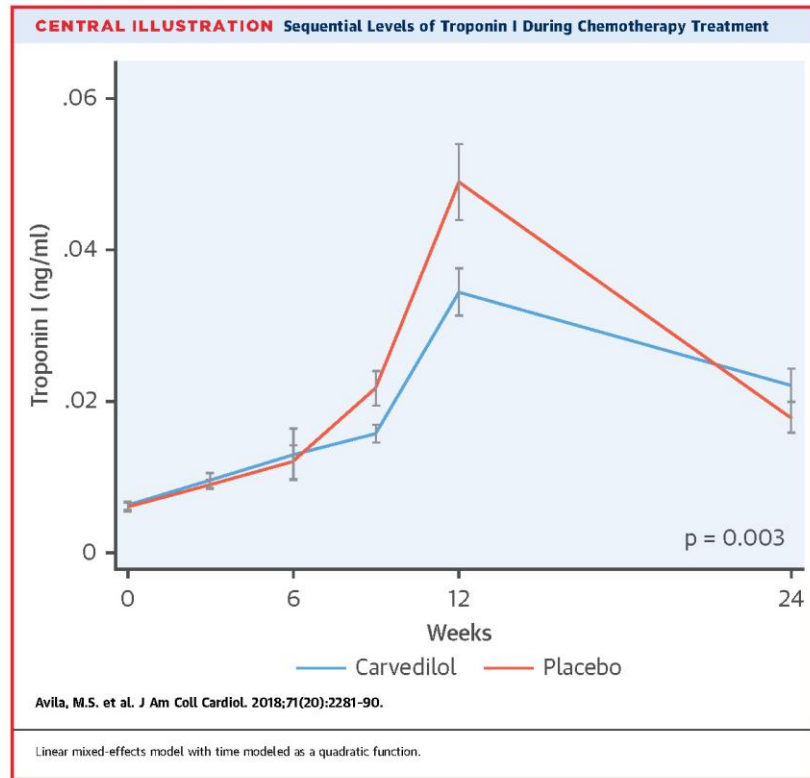


Our TnI results are in accordance with those of a small single-blind trial showing TnI reduction with carvedilol (26). The effect of carvedilol on attenuation of troponin levels is not well understood. Antioxidant pharmacological properties of carvedilol and its protection against free radicals could contribute to its beneficial effects (1). The attenuation of TnI increase could improve prognosis of patients receiving high-dose ANT treatment. High TnI predicts subsequent LVEF reduction and cardiac events (1,27-29). However, there are currently no data showing that troponin-based management improves cardiovascular outcomes in this population. In fact, the correlation between TnI levels and LVEF reduction has been reported in coronary artery disease but not in diffuse myocardial injury or other causes of cardiac troponin release not associated with myocardial ischemia (30). Troponin cardiac release may result from chronic cardiac damage without acute myocardial necrosis (30). In this scenario, evidence exists that any increased serum levels of troponin might be associated with an impaired outcome in various clinical settings (30). Accordingly, our observed discordance between the elevations of troponin without a change in LVEF is not well established. The elevation of troponin in our study was a mild elevation, barely exceeding the upper limit of mortality, demonstrating that chemotherapy

with ANT at these doses may lead to myocardial injury, but this lesion may not be expressive enough to affect myocardial function.

Our results concerning LVEF changes are closed to the recent PRADA trial results with contemporary ANT dosage (17). PRADA also did not demonstrate the protective effect of metoprolol succinate in the primary prevention of cardiotoxicity. This study showed a numerically modest absolute reduction in the LVEF in both groups (placebo group drop of 1.8% and 1.6% in metoprolol group). In our study, the decrease was even lower (drop of 1.3% in placebo group and 0.9% in carvedilol group), though the technique for measuring LVEF was different in the 2 studies, as cardiac magnetic resonance imaging was performed in the PRADA trial.

In contrast with our findings, several randomized trials reported a higher incidence of cardiotoxicity and a beneficial effect of carvedilol or nebivolol in prevention of cardiotoxicity (15,16,26,31,32). Potential explanations for these apparent discrepancies may include small sample sizes, previously reported higher doses of ANT, heterogeneity of included populations with differences in risk factors, cardiovascular comorbidities, types of cancer and chemotherapy protocols, and differences in follow-up duration and in study methodology. Patients receiving high cumulative doses of ANT and with a



higher prevalence of risk factors have a high risk for cardiotoxicity (25).

Despite the lack of differences in the incidence of clinically defined cardiotoxicity across our groups, the use of carvedilol was associated with a tendency toward reduction in LV end-diastolic diameter and attenuation of worsening of diastolic LV function. It suggests that carvedilol could influence LV remodeling in this setting.

**STUDY LIMITATIONS.** First, the clinical trial was conducted in a single center. Despite that, the sample was a representative population of breast cancer patients, and it is, to the best of our knowledge, the largest study using cardiovascular drugs for cardiotoxicity prevention. Second, the incidence of early onset cardiotoxicity was 13.5% to 14.5%, lower than we expected, which might reduce the statistical power to study carvedilol effects. Third, the dose of

carvedilol was optimized during chemotherapeutic treatment and may indicate that the target dose was reached at a later stage of chemotherapy. However, the effect of carvedilol was already noted early at 6 weeks based on heart rate. Also the maximal dose of carvedilol was obtained before the time of the peak of TnI levels and the highest cumulative dose of ANT. Fourth, the maximum tolerated dose of carvedilol and placebo less than what was expected. This finding could be predictable in the carvedilol group but not in the placebo group, suggesting an unknown mechanism of chemotherapy treatment and cancer impairing the titration of the drug even in the placebo arm. Fifth, other parameters to assess diastolic dysfunction have been published more recently (33), but this does not invalidate the evaluation in the present study, because all parameters that were used are extremely reproducible and have had an

important role in the evaluation of diastolic dysfunction and in the prognosis in predicting HF (34). Sixth, the interobserver variability might have influenced the repeated LVEF measurements, though this is unlikely to affect the point estimates of our findings, as this equally affects both groups across time. Seventh, as the primary endpoint was not met, any statements related to the secondary endpoints need to be carefully interpreted, although the additional information provided by the changes in troponin levels and diastolic function over time adds meaningful information and may aid on the mechanistic understanding of the pathophysiology of LV dysfunction in this scenario. And finally, the short follow-up period (6 months) could be considered a limitation. Nevertheless, early reduction in LVEF of 10% has been previously reported at the end of chemotherapy in patients developing cardiotoxicity, and indeed the detection of the initial disease allows the possibility of prompt treatment and consequent recovery of LVEF (12).

#### CONCLUSIONS

The incidence of early onset cardiotoxicity with contemporary doses of ANT was lower than expected with moderate to high doses of ANT. In this scenario, the use of carvedilol did not result in significant changes in LV function in up to 6 months of

follow-up. However, the TnI elevation was significant and attenuated by carvedilol use, suggesting a protective effect of carvedilol in myocardial injury.

**ACKNOWLEDGMENT** The authors extend special thanks to Maria de Lourdes Ribeiro for supporting the administrative logistics of the trial.

**ADDRESS FOR CORRESPONDENCE:** Dr. Edimar Alcides Bocchi, Heart Failure Department, Heart Institute (InCor) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, R. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar 44, São Paulo 05403900, Brazil. E-mail: dclledimar@incor.usp.br.

#### PERSPECTIVES

##### COMPETENCY IN PATIENT CARE AND PROCEDURAL

**SKILLS:** In patients undergoing ANT chemotherapy, carvedilol might prevent or delay the onset of cardiac injury and adverse myocardial remodeling.

**TRANSLATIONAL OUTLOOK:** Clinical trials with longer follow-up are required to evaluate the safety and efficacy of carvedilol for prevention of cardiotoxicity in patients receiving ANT chemotherapy, determine optimum timing and dosing regimens, and delineate the impact of treatment on both cardiac function and clinical outcomes.

#### REFERENCES

- Bloom MW, Hamo CE, Cardinale D, et al. Cancer therapy-related cardiac dysfunction and heart failure: part 1: definitions, pathophysiology, risk factors, and imaging. *Circ Heart Fail* 2016;9:e002661.
- Patnaik JL, Byers T, DiGiuseppe C, Dabelea D, Denberg TD. Cardiovascular disease competes with breast cancer as the leading cause of death for older females diagnosed with breast cancer: a retrospective cohort study. *Breast Cancer Res* 2011;13:R64.
- Ewer MS, Ewer SM. Cardiotoxicity of anticancer treatments. *Nat Rev Cardiol* 2015;12:620.
- Miller KD, Siegel RL, Lin CC, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 2016;66:271-89.
- Suter TM, Ewer MS. Cancer drugs and the heart: importance and management. *Eur Heart J* 2013;34:1102-11.
- Valachis A, Nilsson C. Cardiac risk in the treatment of breast cancer: assessment and management. *Breast Cancer (Dove Med Press)* 2015;7:21-35.
- Henniksen PA. Anthracycline cardiotoxicity: an update on mechanisms, monitoring and prevention. *Heart* 2017 Dec 7 [E-pub ahead of print].
- Vepongsa P, Yeh ET. Prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity: challenges and opportunities. *J Am Coll Cardiol* 2014;64:938-45.
- Bocchi EA, Marcondes-Braga FG, Bacal F, et al. [Updating of the Brazilian guideline for chronic heart failure—2012]. *Arq Bras Cardiol* 2012;98:1-33.
- Hamo CE, Bloom MW. Cancer and heart failure: understanding the intersection. *Card Fail Rev* 2017;3:66-70.
- Cardinale D, Colombo A, Lamantia G, et al. Anthracycline-induced cardiomyopathy: clinical relevance and response to pharmacologic therapy. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:213-20.
- Cardinale D, Colombo A, Bacchiani G, et al. Early detection of anthracycline cardiotoxicity and improvement with heart failure therapy. *Circulation* 2015;131:1981-8.
- Seicean S, Seicean A, Alan N, Plana JC, Budd GT, Marwick TH. Cardioprotective effect of  $\beta$ -adrenoceptor blockade in patients with breast cancer undergoing chemotherapy: follow-up study of heart failure. *Circ Heart Fail* 2013;6:420-6.
- Bosch X, Rovira M, Sitges M, et al. Enalapril and carvedilol for preventing chemotherapy-induced left ventricular systolic dysfunction in patients with malignant hemopathies: the OVERCOME trial (prevention of left ventricular dysfunction with Enalapril and carvedilol in patients submitted to intensive Chemotherapy for the treatment of Malignant Hemopathies). *J Am Coll Cardiol* 2013;61:2355-62.
- Kalay N, Basar E, Ozdogru I, et al. Protective effects of carvedilol against anthracycline-induced cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:2258-62.
- Kaya MG, Ozkan M, Gunebakmaz O, et al. Protective effects of nebivolol against anthracycline-induced cardiomyopathy: a randomized control study. *Int J Cardiol* 2013;167:2306-10.
- Gulati G, Heck SL, Ree AH, et al. Prevention of Cardiac Dysfunction During Adjuvant Breast Cancer Therapy (PRADA): a 2 × 2 factorial, randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial of candesartan and metoprolol. *Eur Heart J* 2016;37:1671-80.
- Eichhorn EJ, Domanski MJ, Krause-Steinrauf H, et al. for the Beta-Blocker Evaluation of Survival Trial Investigators. A trial of the beta-blocker bucindolol in patients with advanced chronic heart failure. *N Engl J Med* 2001;344:1659-67.

19. Yue TL, Cheng HY, Lysko PG, et al. Carvedilol, a new vasodilator and beta adrenoceptor antagonist, is an antioxidant and free radical scavenger. *J Pharmacol Exp Ther* 1992;263:92-8.
20. McGowan JV, Chung R, Maulik A, Piotrowska I, Walker JM, Yellon DM. Anthracycline chemotherapy and cardiotoxicity. *Cardiovasc Drugs Ther* 2017;31:63-75.
21. Ikhosrow-Khavar F, Fillon KB, Al-Qurashi S, et al. Cardiotoxicity of aromatase inhibitors and tamoxifen in postmenopausal women with breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann Oncol* 2017;28:487-96.
22. Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, et al. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* 2015;16:233-70.
23. Nagueh SF, Appleton CP, Gillebert TC, et al. Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 2009;22:107-33.
24. National Institutes of Health. Common Terminology Criteria for Adverse Events v4.0 (CTCAE). Version 4.02. Bethesda, MD: US Department of Health and Human Services, 2009.
25. Zamorano JL, Lancellotti P, Rodriguez Muñoz D, et al. 2016 ESC Position Paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of the ESC Committee for Practice Guidelines: the Task Force for cancer treatments and cardiovascular toxicity of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2016;37:2768-801.
26. Nabati M, Jarbabai G, Baghyari S, Esmaili K, Yazdani J. Cardioprotective effects of carvedilol in inhibiting doxorubicin-induced cardiotoxicity. *J Cardiovasc Pharmacol* 2017;69:279-85.
27. Sawaya H, Sebag IA, Plana JC, et al. Assessment of echocardiography and biomarkers for the extended prediction of cardiotoxicity in patients treated with anthracyclines, taxanes, and trastuzumab. *Circ Cardiovasc Imaging* 2012;5:596-603.
28. Cardinale D, Colombo A, Torrisi R, et al. Trastuzumab-induced cardiotoxicity: clinical and prognostic implications of troponin I evaluation. *J Clin Oncol* 2010;28:3910-6.
29. Cardinale D, Sandri MT, Colombo A, et al. Prognostic value of troponin I in cardiac risk stratification of cancer patients undergoing high-dose chemotherapy. *Circulation* 2004;109:2749-54.
30. Thygesen K, Mair J, Katus H, et al. Recommendations for the use of cardiac troponin measurement in acute cardiac care. *Eur Heart J* 2010;31:2197-204.
31. Tashakori Beheshti A, Mostafavi Toroghi H, Hosseini G, Zarifian A, Homaei Shandiz F, Fazlinezhad A. Carvedilol administration can prevent doxorubicin-induced cardiotoxicity: a double-blind randomized trial. *Cardiology* 2016;134:47-53.
32. Elitok A, Oz F, Cizgici AY, et al. Effect of carvedilol on silent anthracycline-induced cardiotoxicity assessed by strain imaging: a prospective randomized controlled study with six-month follow-up. *Cardiol J* 2014;21:509-15.
33. Nagueh SF, Smiseth OA, Appleton CP, et al. Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* 2016;17:1321-60.
34. Troughton RW, Prior DL, Frampton CM, et al. Usefulness of tissue Doppler and color M-mode indexes of left ventricular diastolic function in predicting outcomes in systolic left ventricular heart failure (from the ADEPT study). *Am J Cardiol* 2005;96:257-62.

**KEY WORDS**  $\beta$ -blockers, cardiomyopathy, chemotherapy, prevention, troponin

**APPENDIX** For supplemental figures and tables, please see the online version of this paper.

## **9 Referências**

---

## 9 REFERÊNCIAS

1. Timmis A, Townsend N, Gale C, Grobbee R, Maniadakis N, Flather M, et al.; ESC Scientific Document Group. European Society of Cardiology: Cardiovascular disease Statistics 2017. *Eur Heart J*. 2018;39(7):508-79.
2. Nowbar AN, Gitto M, Howard JP, Francis DP, Al-Lamee R. Mortality from ischemic heart disease: analysis of data from the World Health Organization and Coronary Artery Disease Risk Factors from NCD Risk Factor Collaboration. *Cir Cardiovasc Qual Outcomes*. 2019;12(6):e005375.
3. Ni H, Xu J. Recent trends in heart failure-related mortality: United States, 2000-2014. *NCHS Data Brief*. 2015;231:1-8.
4. Bocchi EA. Heart failure in South America. *Curr Cardiol Rev*. 2013;9(2):147-56.
5. Albuquerque DC, Souza Neto JD, Bacal F, Rohde LEP, Bernardes-Pereira S, Berwanger O, Almeida DR. I Brazilian Registry of Heart Failure - clinical aspects, care quality and hospitalizations outcomes. *Arq Bras Cardiol*. 2015;104(6):433-42.
6. Francis GS. Acute heart failure: patient management of a growing epidemic. *Am Heart Hosp J*. 2004;2(4 Suppl 1):10-4.
7. Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, De Simone G, Ferguson T, Flegal K, et al. Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 2009;119(3):480-6.
8. Zambelli A, Della Porta MG, Eleuteri E, De Giuli L, Catalano O, Tondini C, et al. Predicting and preventing cardiotoxicity in the era of breast

cancer targeted therapies. Novel molecular tools for clinical issues. *Breast*. 2011;20(2):176-83.

9. Torre LA, Islami F, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global cancer in women: burden and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2017;26(4):444-57.

10. Bloom MW, Hamo CE, Cardinale D, Ky B, Nohria A, Baer L, et al. Cancer therapy-related cardiac dysfunction and heart failure: Part 1: definitions, pathophysiology, risk factors, and imaging. *Circ Heart Fail*. 2016;9(1):e002661.

11. Suter TM, Ewer MS. Cancer drugs and the heart: importance and management. *Eur Heart J*. 2013;34(15):1102-11.

12. Valachis A, Nilsson C. Cardiac risk in the treatment of breast cancer: assessment and management. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 2015;7:21-35.

13. Henriksen PA. Anthracycline cardiotoxicity: an update on mechanisms, monitoring and prevention. *Heart*. 2018;104(12):971-7.

14. Felker GM, Thompson RE, Hare JM, Hruban RH, Clemetson DE, Howard DL, et al. Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2000;342(15):1077-84.

15. Cardinale D, Colombo A, Bacchiani G, Tedeschi I, Meroni CA, Veglia F, et al. Early detection of anthracycline cardiotoxicity and improvement with heart failure therapy. *Circulation*. 2015;131(22):1981-8.

16. Alexander J, Dainiak N, Berger HJ, Goldman L, Johnstone D, Reduto L, et al. Serial assessment of doxorubicin cardiotoxicity with quantitative radionuclide angiocardiology. *N Engl J Med*. 1979;300(6):278-83.

17. U. S. Department of Health and Human Services. National Institutes of Health, National Cancer Institute. Common terminology criteria for adverse events (CTCAE) v4.0. 2009.
18. Schwartz RG, McKenzie WB, Alexander J, Sager P, D'Souza A, Manatunga A, et al. Congestive heart failure and left ventricular dysfunction complicating doxorubicin therapy. Seven-year experience using serial radionuclide angiocardiology. *Am J Med.* 1987;82(6):1109-18.
19. U. S. Department of Health and Human Services. National Institutes of Health, National Cancer Institute. Common Terminology Criteria for Adverse Events: National Institute of Health; 2010. Available from: <http://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE>.
20. Plana JC, Galderisi M, Barac A, Ewer MS, Ky B, Scherrer-Crosble M, et al. Expert consensus for multimodality imaging evaluation of adult patients during and after cancer therapy: a report from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J Am Soc Echocardiogr.* 2014;27(9):911-39.
21. Zamorano JL, Lancellotti P, Rodriguez Muñoz D, Aboyans V, Asteggiano R, Galderisi M, et al. 2016 ESC Position Paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of the ESC Committee for Practice Guidelines The Task Force for cancer treatments and cardiovascular toxicity of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* 2016;37(36):2768-801.
22. Ewer MS, Ewer SM. Cardiotoxicity of anticancer treatments. *Nat Rev Cardiol.* 2015;12(11):620.
23. Miller KD, Siegel RL, Lin CC, Mariotto AB, Kramer JL, Rowland JH, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016;66(4):271-89.



24. Lindenfeld J, Albert NM, Boehmer JP, Collins SP, Ezekowitz JA, Givertz MM, et al. HFSA 2010 Comprehensive Heart Failure Practice Guideline. *J Card Fail.* 2010;16(6):e1-194.
25. Davies KJ, Doroshow JH. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria: I. anthracycline radical formation by NADH dehydrogenase. *J Biol Chem.* 1986;261(7):3060-7.
26. Raber I, Asnani A. Cardioprotection in cancer therapy: novel insights with anthracyclines. *Cardiovasc Rea.* 2019;115(5):919-21.
27. Tewey KM, Rowe TC, Yang L, Halligan BD, Liu LF. Adriamycin-induced DNA-damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science.* 1984;226(4673):466-8.
28. Ichikawa Y, Ghanefar M, Bayeva M, Wu R, Khechaduri A, Naga Prasad SV, et al. Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation. *J Clin Invest.* 2014;124(2):617-30.
29. Zhang S, Liu X, Bawa-Khalfe T, Lu LS, Lyu YL, Liu LF, Yeh ET. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med.* 2012;18(11):1639-42.
30. Luu Az, Chowdhury B, Al-Omran M, Teoh H, Hess DA, Verma S. Role of endothelium in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *JAAC: Basic Transl Sci.* 2018;3(6):861-70.
31. Davies KJ, Doroshow JH, Hochstein P. Mitochondrial NADH dehydrogenase-catalysed oxygen radical production by adriamycin, and the relative inactivity of 5-iminodaunorubicin. *FEBS Lett.* 1983;153(1):227-30.
32. Henriksen PA. Anthracycline cardiotoxicity: an update on mechanisms, monitoring and prevention. *Heart.* 2018;104(12):971-7.

33. Sheppard RJ, Berger J, Sebag IA. Cardiotoxicity of cancer therapeutics: current issues in screening, prevention and therapy. *Front Pharmacol.* 2013;4:19.
34. Steinherz LJ, Steinherz PG, Tan CT, Heller G, Murphy ML. Cardiac toxicity 4 to 20 years after completing anthracycline therapy. *JAMA.* 1991;266(12):1672-7.
35. Zamorano JL, Lancellotti P, Muñoz DR, Aboyans V, Asteggiano R, Galderisi M, et al. 2016 ESC position paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of the ESC Committee for Practice Guidelines. *Eur Heart J.* 2016;37(36):2768-801.
36. Avila MS, Ayub-Ferreira SM, de Barros Wanderley MR Jr, das Dores Cruz F, Gonçalves Brandão SM, Rigaud VOC, et al. Carvedilol for prevention of chemotherapy-related cardiotoxicity: the CECCY trial. *J Am Coll Cardiol.* 2018;71(20):2281-90.
37. Cardinale D, Colombo A, Lamantia G, Colombo N, Civelli M, De Giacomo G, et al. Anthracycline-induced cardiomyopathy: clinical relevance and response to pharmacologic therapy. *J Am Coll Cardiol* 2010;55(3):213-20.
38. Ng R, Better N, Green M. Anticancer agents and cardiotoxicity. *Semin Oncol.* 2006;33(1):2-14.
39. Myocardial infarction redefined - a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2000;21(18):1502-13.
40. Cardinale D, Sandri MT, Colombo A, Colombo N, Boeri M, Lamantia G, et al. Prognostic value of troponin I in cardiac risk stratification of cancer

patients undergoing high-dose chemotherapy. *Circulation*. 2004;109(22):2749-54.

41. Bosch X, Rovira M, Sitges M, Domenech A, Ortiz-Pérez JT, de Caralt TM, et al. Enalapril and carvedilol for preventing chemotherapy-induced left ventricular systolic dysfunction in patients with malignant hemopathies: the OVERCOME trial (prevention of left Ventricular dysfunction with Enalapril and carvedilol in patients submitted to intensive Chemotherapy for the treatment of Malignant hemopathies). *J Am Coll Cardiol*. 2013;61(23):2355-362.

42. Gulati G, Heck SL, Røsjø H, Ree AH, Hoffmann P, Hagve TA, et al. Neurohormonal blockade and circulating cardiovascular biomarkers during anthracycline therapy in breast cancer patients: results from the PRADA (Prevention of Cardiac Dysfunction During Adjuvant Breast Cancer Therapy) study. *J Am Heart Assoc*. 2017;6(11):e006513.

43. Sawaya H, Sebag IA, Plana JC, Januzzi JL, Ky B, Cohen V, et al. Early detection and prediction of cardiotoxicity in chemotherapy-treated patients. *Am J Cardiol*. 2011;107(9):1375-80.

44. Chaudry M, Banchs J, Chavez-MacGregor M. Anthracycline or trastuzumab-related cardiotoxicity: do we have a predictive biomarker? *Biomark Med*. 2016;10(3):315-28.

45. Tsuchida K, Tanabe K. Plasma brain natriuretic peptide concentrations and the risk of cardiovascular events and death in general practice. *J Cardiol*. 2008;52(3):212-23.

46. Reichlin T, Socrates T, Egli P, Potocki M, Breidthardt T, Arenja N, et al. Use of myeloperoxidase for risk stratification in acute heart failure. *Clin Chem*. 2010;56(6):944-51.

47. Nicholls SJ, Hazen SL. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. *Arterioscl Thromb Vasc Biol.* 2005;25(6):1102-11.
48. Brennan ML, Penn MS, Van Lente F, Nambi V, Shishehbor MH, Aviles RJ, et al. Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. *N Eng J Med* 2003;349(17):1595-604.
49. Tang WH, Brennan ML, Philip K, Tong W, Mann S, Van Lente F, Hazen SL. Plasma myeloperoxidase levels in patients with chronic heart failure. *Am J Cardiol* 2006;98(6):796-9.
50. Kaya MG, Ozkan M, Gunebakmaz O, Akkaya H, Kaya EG, Akpek M, et al. Protective effects of nebivolol against anthracycline-induced cardiomyopathy: a randomized control study. *Int J Cardiol.* 2013;167(5):2306-10.
51. Tang WH, Tong W, Troughton RW, Martin MG, Shrestha K, Borowski A, et al. Prognostic value and echocardiographic determinants of plasma myeloperoxidase levels in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49(24):2364-70.
52. Baldus S, Heeschen C, Meinertz T, Zeiher AM, Eiserich JP, Münzel T, Simoons ML, Hamm CW; CAPTURE Investigators. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 2003;108(12):1440-5.
53. Scharnagl H, Kleber ME, Genser B, Kickmaier S, Renner W, Weihrauch G, et al. Association of myeloperoxidase with total and cardiovascular mortality in individuals undergoing coronary angiography - the LURIC study. *Int J Cardiol.* 2014;174(1):96-105.
54. Ali M, Pulli B, Courties G, Tricot B, Sebas M, Iwamoto Y, et al. Myeloperoxidase inhibition improves ventricular function and remodeling

after experimental myocardial infarction. *JACC Basic Transl Sci.* 2016;1(7):633-43.

55. Ky B, Putt M, Sawaya H, French B, Januzzi JL Jr, Sebag IA, et al. Early increases in multiple biomarkers predict subsequent cardiotoxicity in patients with breast cancer treated with doxorubicin, taxanes and trastuzumab. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63(8):809-16.

56. Putt M, Hahn VS, Januzzi JL, Sawaya H, Sebag IA, Plana JC, Picard MH, et al. Longitudinal changes in multiple biomarkers are associated with cardiotoxicity in breast cancer patients treated with doxorubicin, taxanes and trastuzumab. *Clin Chem.* 2015;61(9):1164-72.

57. Ananthan K, Lyon AR. The role of biomarkers in cardio-oncology. *J Cardiovasc Trans Res.* 2020;13(3):431-450.

58. Karatolios K, Chatzis G, Holzendorf V, Störk S, Richter A, Binas D, et al. Galectin-3 as a predictor of left ventricular reverse remodeling in recent-onset dilated cardiomyopathy. *Dis Markers.* 2018;2018:2958219.

59. Bulten BF, Verberne HJ, Bellersen L, Oyen WJ, Sabaté-Llobera A, Mavinkurve-Groothuis AM, et al. Relationship of promising methods in the detection of anthracycline-induced cardiotoxicity in breast cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2015;76(5):957-67.

60. Jansen H, Wolfgang K, Jaensch A, Mons U, Breitling LP, Scharnagl H, et al. Prognostic utility of galectin-3 for recurrent cardiovascular events during long-term follow-up in patients with stable coronary heart disease: results of the Karola Study. *Clin Chem.* 2016;62(10):1372-9.

61. Lok DJ, Van der Meer P, De La Porte PW, Lipsic E, Van Wijngaarden J, Hillege HL, van Veldhuisen DJ. Prognostic value of galectin-3, a novel

marker of fibrosis, in patients with chronic heart failure: data from the DEAL-HF study. *Clin Res Cardiol.* 2010;99(5):323-8.

62. Van Kimmennade RR, Januzzi Jr JL, Ellinor PT, Sharma UC, Bakker JA, Low AF, et al. Utility of amino-terminal pro-brain natriuretic peptide, galectin-3 and apelin for the evaluation of patients with acute heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2006;48(6):1217-24.

63. Jagodzinski A, Havullina AS, Appelbaum S, Zeller T, Jousilahti P, Skytte-Johanssen S, et al. Predictive value of galectin-3 for incident cardiovascular disease and heart failure in the population-based FINRISK 1997 cohort. *Int J Cardiol.* 2015;192:33-9.

64. Karanth NV, Roy A, Joseph M, de Pasquale C, Karapetis C, Koczwara B. Utility of prechemotherapy echocardiographical assessment of cardiac abnormalities. *Support Care Cancer.* 2011;19(12):2021-6.

65. Cardinale D, Sandri MT. Role of biomarkers in chemotherapy-induced cardiotoxicity. *Prog Cardiovasc Dis.* 2010;53(2):121-9.

66. Santos DL, Moreno AJ, Leino RL, Froberg MK, Wallace KB. Carvedilol protects against doxorubicin-induced mitochondrial cardiomyopathy. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002;185(3):218-27.

67. Spallarossa P, Garibaldi S, Altieri P, Fabbi P, Manca V, Nasti S, et al. Carvedilol prevents doxorubicin-induced free radical release and apoptosis in cardiomyocytes in vitro. *J Mol Cell Cardiol.* 2004;37(4):837-46.

68. Kalay N, Basar E, Ozdogru I, Er O, Cetinkaya Y, Dogan A, et al. Protective effects of carvedilol against anthracycline-induced cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48(11):2258-62.

69. El-Shitany NA, Tolba OA, El-Shashory MR, El-Hawary EE. Protective effect of carvedilol on adriamycin-induced left ventricular dysfunction in children with acute lymphoblastic leucemia. *J Card Fail.* 2012;18(8):607-13.
70. Nabati M, Janbabai G, Baghyari S, Esmaili K, Yazdani J. Cardioprotective effects of carvedilol in inhibiting doxorubicin-induced cardiotoxicity. *J Cardio Pharmacol.* 2017;69(5):279-85.
71. Gulati G, Heck SL, Ree AH, Hoffmann P, Schulz-Menger J, Fagerland MW, et al. Prevention of cardiac dysfunction during adjuvant breast cancer therapy (PRADA): a 2 × 2 factorial, randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial of candesartan and metoprolol. *Eur Heart J.* 2016;37(21):1671-80.
72. Cardinale D, Colombo A, Sandri MT, Lamantia G, Colombo N, Civelli M, et al. Prevention of high-dose chemotherapy-induced cardiotoxicity in high-risk patients by angiotensin-converting enzyme inhibition. *Circulation.* 2006;114(23):2474-81.
73. Hamo CE, Bloom MW. Cancer and heart failure: understanding the intersection. *Card Fail Rev.* 2017;3(1):66-70
74. Bocchi EA, Marcondes-Braga FG, Ayub-Ferreira SM, Rohde LE, Oliveira WA, Almeida DR, et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica. *Arq Bras Cardiol.* 2009;93(1supl.1):1-71.
75. Yun S, Vincelette ND, Abraham I. Cardioprotective role of  $\beta$ -blockers and angiotensin antagonists in early-onset anthracyclines-induced cardiotoxicity in adult patients: a systematic review and meta-analysis. *Postgrad Med J.* 2015;91(1081):627-33.

- 
76. Khosrow-Khavar F, Filion KB, Al-Qurashi S, Torabi N, Bouganim N, Suissa S, et al. Cardiotoxicity of aromatase inhibitors and tamoxifen in postmenopausal women with breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann Oncol*. 2017;28(3):487-96.
77. Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Afilalo J, Armstrong A, Ernande L, et al. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2015;16(3):233-70.
78. Januzzi JL Jr, Camargo CA, Anwaruddin S, Baggish AL, Chen AA, Krauser DG, et al. The N-Terminal Pro-BNP Investigation of Dyspnea in the Emergency Department (PRIDE) study. *Am J Cardiol*. 2005;95(8):948-54.
79. Hara A, Niwa M, Kanayama T, Noguchi K, Niwa A, Matsuo M, et al. Galectin-3: A potential prognostic and diagnostic marker for heart disease and detection of early stage pathology. *Biomolecules*. 2020;10(9):1277-94.
80. Lau D, Baldus S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacol Ther*. 2006;111(1):16-26.
81. Hoy A, Trégouet D, Leininger-Muller B, Poirier O, Maurice M, Sass C, et al. Serum myeloperoxidase concentration in a healthy population: biological variations, familial resemblance and new genetic polymorphisms. *Eur J Hum Genet*. 2001;9(10):780-6.