

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CARVEDILOL,  
CICLOSPORINA A E CITRATO DE SILDENAFIL SOBRE A  
CARDIOTOXICIDADE INDUZIDA PELA DOXORRUBICINA  
EM MODELO EXPERIMENTAL COM COELHOS**

**Fernando Azadinho Rosa**

Médico Veterinário

**2016**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CARVEDILOL,  
CICLOSPORINA A E CITRATO DE SILDENAFIL SOBRE A  
CARDIOTOXICIDADE INDUZIDA PELA DOXORRUBICINA  
EM MODELO EXPERIMENTAL COM COELHOS**

**Fernando Azadinho Rosa**

**Orientador: Prof. Dr. Aparecido Antonio Camacho**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Clínica Médica Veterinária).

**2016**

Rosa, Fernando Azadinho  
R788a Avaliação dos efeitos do carvedilol, ciclosporina A e citrato de sildenafil sobre a cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina em modelo experimental com coelhos / Fernando Azadinho Rosa. -- Jaboticabal, 2016  
xix, 109 p. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016  
Orientador: Aparecido Antonio Camacho  
Banca examinadora: Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, Andriago Barboza de Nardi, Fábio Nelson Gava, Renata Maria Lataro  
Bibliografia

1. Apoptose. 2. Ecodopplercardiografia. 3. Eletrocardiografia. 4. Microscopia eletrônica de transmissão. 5. Proteção miocárdica. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.12:636.92

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CARVEDILOL, CICLOSPORINA A E CITRATO DE SILDENAFIL SOBRE A CARDIOTOXICIDADE INDUZIDA PELA DOXORRUBICINA EM MODELO EXPERIMENTAL COM COELHOS.

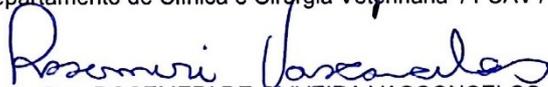
AUTOR: FERNANDO AZADINHO ROSA

ORIENTADOR: APARECIDO ANTONIO CAMACHO

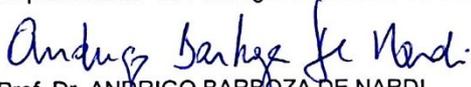
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em MEDICINA VETERINÁRIA, área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. APARECIDO ANTONIO CAMACHO  
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS  
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. ANDRIGO BARBOZA DE NARDI  
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Pós-Doutorando FÁBIO NELSON GAVA  
FACULDADE DE MEDICINA / FMRP - USP / Ribeirão Preto/SP



Pós-doutoranda RENATA MARIA LATARO  
FACULDADE DE MEDICINA / FMRP - USP / Ribeirão Preto/SP

Jaboticabal, 24 de fevereiro de 2016

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**FERNANDO AZADINHO ROSA** – nascido aos 20 dias do mês de fevereiro do ano 1985, na cidade de Fernandópolis, Estado de São Paulo. Em 2003, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, câmpus de Araçatuba. Entre junho de 2005 e maio de 2006 realizou projeto de iniciação científica no Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, sendo bolsista pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), sob orientação da Prof.<sup>a</sup> Adjunto Mary Marcondes. Graduou-se como Médico Veterinário em dezembro de 2007 e em seguida participou do programa de Residência Médico-Veterinária na área de Clínica Médica, Cirurgia e Anestesiologia de Pequenos Animais, com ênfase em Clínica Médica, no período de fevereiro de 2008 a janeiro de 2010, na mesma instituição de ensino, sob orientação do Prof. Ass. Dr. Wagner Luis Ferreira. Em agosto de 2010 ingressou no Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, na área de Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, na mesma universidade, período em que foi bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), concluindo o curso em fevereiro de 2012, sob orientação da Prof.<sup>a</sup> Adjunto Gisele Fabrino Machado. Em março de 2012, ingressou no Curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, na área de Clínica Médica, junto à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, câmpus de Jaboticabal, sob a orientação do Prof. Dr. Aparecido Antonio Camacho. Foi bolsista de doutorado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e desenvolveu projeto de pesquisa financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Entre os meses de fevereiro e outubro de 2015, realizou estágio de doutorado pelo Programa Institucional de Bolsas Sanduíche no Exterior (PDSE-CAPES) junto ao “Department of Comparative Biomedical Sciences”, da Universidade Estadual da Louisiana – LSU, Estados Unidos, sob orientação do Prof. Dr. Joseph Francis.

“O reverso da disposição de lutar contra a maré montante do amor-próprio na busca do conhecimento é a capitulação da mente que se entrega e se deixa levar pela doce vazante do auto-engano. Quando as águas profundas se agitam e desgovernam, a lógica naufraga e o intelecto, por mais formidável que seja, vira brinquedo na correnteza do acreditar”.

**Eduardo Giannetti**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela vida;

Aos meus pais e minha irmã por acreditarem em mim, e pelo apoio incondicional na realização de mais essa etapa da minha vida. Sou eternamente grato pelas oportunidades que me proporcionaram com seu trabalho diário, e não teria chegado a lugar algum sem seu apoio e, principalmente, sem seus ensinamentos e educação.

À minha namorada Gabi, que sempre me ajudou imensamente em tudo que estivesse ao seu alcance. Agradeço por todo seu apoio, dedicação, companheirismo e compreensão, principalmente na fase final dessa trajetória.

Ao professor Aparecido Antonio Camacho, não apenas pela orientação, mas pela confiança, ensinamentos e amizade, desde a fase final do mestrado. Sou imensamente grato por ter aberto as portas do seu Serviço, sempre nos apoiando na realização de nossos estudos e ao mesmo tempo estimulando nosso aperfeiçoamento profissional prestando atendimento na rotina do Hospital Veterinário.

Aos colegas do Serviço de Cardiologia, os “Cardiologas” pelo companheirismo e amizade. Fábio, Evandro, Edna, Jorge, Roberto, Fabrício, Rodrigo, Felipe, Ana Paula, Rafael, Sheila e Murillo, o último, na ocasião, bolsista de iniciação científica pelo Serviço de Cardiologia. Não há palavras que possam descrever quão bom é poder trabalhar com uma equipe tão forte e unida, sempre disposta a ajudar no que for preciso! Muito obrigado!

Ao Departamento de Patologia Veterinária, em especial à professora Rosemeri de Oliveira Vasconcelos e à Pamela Reina, por abrirem as portas do laboratório para o processamento das amostras e auxílio na análise das mesmas. Agradeço imensamente à professora Rose por toda a disposição e boa vontade em ajudar, e pelas horas de ensinamentos desde as leituras das lâminas até a apresentação dos resultados e redação da discussão. Sua dedicação à pesquisa e ao ensino é exemplo a ser seguido!

À equipe do Laboratório de Patologia Clínica, em especial ao professor Aureo Evangelista Santana, Nathan Cruz, Fernanda Mairos, Mateus e Douglas pela imensa ajuda com o processamento das amostras.

Aos professores Mary Marcondes, Wagner Luiz Ferreira e Marlos Gonçalves Sousa pelo apoio, exemplo, amizade e disposição em ajudar a todo momento. Assim como o professor Camacho, minha eterna admiração e gratidão.

Ao Dr. Joseph Francis, professor responsável pelo Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular da Escola de Medicina Veterinária da “Louisiana State University”, pela oportunidade da orientação durante participação do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE-CAPES). Agradeço também aos seus demais orientados: Phillip Ebenezer, Anand Nair, Michael Ogundele e Gustavo Masson, que tanto me ajudaram nesse novo desafio de trabalhar com uma rotina totalmente diferente.

Aos tantos amigos do Antro do HV, com quem tive a oportunidade de conviver durante essa fase importante de minha vida: Evandro, Viçosa, Pedro Paulo, Felipe, Psico, Dido, Tofu, Bruninho, Murillo, Alejandro, Naza, Tatá, Andreção, Sufrido, Mariano, Aladin, Gilmar e Buda.

Aos amigos Tiago, Danilo e Felipe, meus “roommates” em Baton Rouge, e aos demais amigos feitos em nos Estados Unidos. Tenho plena certeza de que a convivência com tantos brasileiros fez com que tudo se tornasse mais fácil e agradável.

À Teresa, do Laboratório de Microscopia Eletrônica da USP – Ribeirão Preto; à Cláudia Ribeirinho, do Laboratório de Microscopia Eletrônica da UNESP – Jaboticabal e à “Chica”, do Departamento de Patologia Veterinária da UNESP – Jaboticabal, pelo processamento das amostras a auxílio com as leituras das mesmas. Ao José, Lauro e Bertanha, servidores do Hospital Veterinário pela ajuda com coelhos sempre que necessário.

Aos professores Júlio Carlos Canola, Mirela Tinucci. Costa, Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, Andriago Barboza de Nardi, Fábio Nelson Gava e Renata Maria Lataro pelas valiosas considerações apresentadas durante o exame geral de qualificação e a defesa da tese de doutorado.

Aos animais que foram incluídos na presente investigação. Que os nossos resultados contribuam para aprimorar os conhecimentos sobre a enfermidade em estudo, para que seu sacrifício tenha valido a pena, e que outras vidas possam ser salvas com os resultados trazidos pelo mesmo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas de doutorado e doutorado sanduíche - Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE-CAPES).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro (processo n.º 2012/18454-5) concedido para a viabilização desse estudo.

A todos aqueles que de alguma forma colaboraram com a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT .....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
LISTA DE TABELAS .....	xvi
LISTA DE FIGURAS .....	xvii
1. INTRODUÇÃO .....	20
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	22
2.1 Cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina .....	22
2.2 Prevenção dos efeitos cardiotóxicos induzidos pela doxorrubicina.....	27
3. OBJETIVOS .....	31
3.1 Objetivos específicos .....	31
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1. Animais e grupos experimentais .....	32
4.2. Indução de cardiomiopatia com doxorrubicina.....	33
4.3. Protocolo terapêutico para prevenção da cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina .....	33
4.4. Exames subsidiários .....	34
4.4.1. Avaliação hematológica e bioquímica sérica .....	36
4.4.2. Avaliação eletrocardiográfica.....	36
4.4.3. Avaliação ecodopplercardiográfica .....	37
4.5. Eutanásia e coleta de material .....	39
4.6. Avaliação histopatológica.....	40
4.7. Avaliação imunoistoquímica.....	40
4.8. Microscopia eletrônica de transmissão .....	41
4.9. Análise estatística .....	42
5. RESULTADOS .....	44
5.1. Mortalidade .....	44
5.2. Avaliação hematológica .....	44

5.3. Bioquímica sérica.....	46
5.4. Avaliação eletrocardiográfica .....	47
5.5. Avaliação ecodopplercardiográfica .....	50
5.6. Avaliação macroscópica .....	54
5.7. Avaliação histopatológica.....	55
5.8. Avaliação imunoistoquímica.....	59
5.9. Microscopia eletrônica de transmissão .....	62
6. DISCUSSÃO .....	65
6.1. Toxicidade induzida pela doxorrubicina em coelhos.....	65
6.2. Cardioproteção farmacológica na cardiomiopatia induzida pela doxorrubicina em coelhos.....	81
7. CONCLUSÕES .....	91
8. REFERÊNCIAS.....	92
APÊNDICES.....	106



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Jaboticabal



## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 020383/13 do trabalho de pesquisa intitulado "Avaliação dos efeitos do carvedilol, ciclosporina A e citrato de sildenafil sobre a cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina em modelo experimental com coelhos", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Aparecido Antonio Camacho está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 08 de outubro de 2013.

Jaboticabal, 08 de outubro de 2013.



Prof. Dr. Mateus José Rodrigues Paranhos da Costa  
Vice-Coordenador - CEUA

## **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CARVEDILOL, CICLOSPORINA A E CITRATO DE SILDENAFIL SOBRE A CARDIOTOXICIDADE INDUZIDA PELA DOXORRUBICINA EM MODELO EXPERIMENTAL COM COELHOS**

**RESUMO** – A doxorubicina é um dos mais eficazes agentes quimioterápicos atualmente disponíveis. No entanto, seu emprego tem sido limitado por sua ação cardiotoxica principalmente quando de seu uso por período prolongado, podendo induzir cardiomiopatia iatrogênica relacionada à dose cumulativa administrada. No presente estudo, avaliou-se a ação de três fármacos (carvedilol, ciclosporina-A e sildenafil) sobre os efeitos cardiotoxicos exercidos pela doxorubicina. Foram utilizados 45 coelhos, alocados em cinco grupos: controle, doxorubicina (DOX), DOX + carvedilol, DOX + ciclosporina-A, DOX + sildenafil. A antraciclina foi administrada por seis semanas, e exames seriados de hematologia, bioquímica sérica, eletrocardiografia e ecocardiografia foram realizados. Ao término de oito semanas, os animais foram submetidos a eutanásia e fragmentos de miocárdio foram utilizados para realização de exames de histopatologia, imunoistoquímica e microscopia eletrônica de transmissão. Os tratamentos testados não evitaram a ocorrência de disfunção sistólica, cardiomegalia e insuficiência cardíaca congestiva nem reduziram a mortalidade ocasionada pelo tratamento com doxorubicina. No entanto, o tratamento concomitante com carvedilol reduziu o número de animais com disfunção diastólica do ventrículo esquerdo, reduziu o número de fibras apoptóticas e a ocorrência de fibrose intersticial nos ventrículos direito e esquerdo. Os dados obtidos permitem inferir que o tratamento com carvedilol resultou em melhora em alguns dos parâmetros avaliados, sugerindo um efeito de proteção miocárdica conferido por esse agente sobre a cardiomiopatia induzida pela doxorubicina em modelo experimental com coelhos.

**Palavras-chave:** apoptose, ecodopplercardiografia, eletrocardiografia, microscopia eletrônica de transmissão, proteção miocárdica.

**ASSESSMENT OF THE EFFECTS OF CARVEDILOL, CYCLOSPORIN A AND  
SILDENAFIL CITRATE ON DOXORUBICIN-INDUCED CARDIOTOXICITY IN AN  
EXPERIMENTAL MODEL WITH RABBITS**

**ABSTRACT** – Doxorubicin is one of the most effective chemotherapeutic agents currently available. However, its use has been limited by its cardiotoxic effect, especially when used for a long time, leading to iatrogenic cardiomyopathy, related to the cumulative dose administered. In the present study, the effects of three drugs (carvedilol, cyclosporin-A and sildenafil) on doxorubicin-induced cardiomyopathy were analyzed. Forty five rabbits were allocated in four groups: control, doxorubicin (DOX), DOX + carvedilol, DOX + cyclosporin-A, DOX + sildenafil. Animals received doxorubicin for six weeks and were monitored for eight weeks by hematological and biochemical evaluations, electrocardiography and echocardiography. At week eight, animals were killed and myocardium was analyzed by histopathology, immunohistochemistry and transmission electron microscopy. Any treatment prevented the development of systolic dysfunction, cardiomegaly and heart failure or reduced mortality induced by doxorubicin. However, treatment with carvedilol reduced the number of rabbits with left ventricle diastolic dysfunction, reduced the number of apoptotic cells and the occurrence of interstitial fibrosis in both ventricles. The results showed that treatment with carvedilol improved some of the evaluated parameters, suggesting that this drug has some cardioprotective effect on doxorubicin-induced cardiomyopathy in rabbits.

**Keywords:** apoptosis, echocardiography, electrocardiography, transmission electron microscopy, cardioprotection.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variâncias
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
bpm	Batimentos por minuto
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DAB	Diaminobenzidina
DCIV	Distúrbio de condução intraventricular
DIVEd	Diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole
DIVEs	Diâmetro interno do ventrículo esquerdo em sístole
DOX	Doxorrubicina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FCAV	Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
FEC	Fração de encurtamento
FEJ	Fração de ejeção
FIA	Fator indutor de apoptose
G1	Grupo doxorrubicina
G2	Grupo doxorrubicina + carvedilol
G3	Grupo doxorrubicina + ciclosporina-A
G4	Grupo doxorrubicina + sildenafil
GC	Grupo controle
ITEI	Índice de desempenho miocárdico de Tei
M0	Momento zero (basal)
M1	Momento 1 (dia 13)
M2	Momento 2 (dia 27)
M3	Momento 3 (dia 41)
M4	Momento 4 (dia 55)
MANOVA	Análise de variância de duas vias

PDE-5	Fosfodiesterase-5
PLVEd	Espessura da parede livre do ventrículo esquerdo em diástole
SIVd	Espessura do septo interventricular em diástole
TDI	Doppler tecidual
TEVE	Tempo de ejeção do ventrículo esquerdo
TRIV	Tempo de relaxamento isovolumétrico
UNESP	Universidade Estadual Paulista
USP	Universidade de São Paulo
VD	Ventrículo direito
VE	Ventrículo esquerdo

**LISTA DE TABELAS**

		<b>Página</b>
<b>Tabela 1.</b>	Médias $\pm$ desvios padrão dos parâmetros hematológicos dos coelhos dos grupos G1, G2, G3 e G4 durante protocolo de indução de cardiomiopatia por doxorubicina. Unesp, Jaboticabal, SP (2016).	45
<b>Tabela 2.</b>	Médias $\pm$ desvios padrão dos parâmetros de bioquímica sérica dos coelhos dos grupos G1, G2, G3 e G4 durante protocolo de indução de cardiomiopatia por doxorubicina. Unesp, Jaboticabal, SP (2016).	46
<b>Tabela 3.</b>	Médias $\pm$ desvios padrão dos parâmetros eletrocardiográficos dos coelhos dos grupos G1, G2, G3 e G4 durante protocolo de indução de cardiomiopatia por doxorubicina. Unesp, Jaboticabal, SP (2016).	48
<b>Tabela 4.</b>	Percentual de coelhos com distúrbio de condução intraventricular nos grupos G1, G2, G3 e G4 durante protocolo de indução de cardiomiopatia por doxorubicina. Unesp, Jaboticabal, SP (2016).	49
<b>Tabela 5.</b>	Médias $\pm$ desvios padrão dos parâmetros ecocardiográficos dos coelhos dos grupos G1, G2, G3 e G4 durante protocolo de indução de cardiomiopatia por doxorubicina. Unesp, Jaboticabal, SP (2016).	53
<b>Tabela 6.</b>	Médias $\pm$ desvios padrão de parâmetros ecocardiográficos e percentual de animais com padrão normal de relaxamento ventricular esquerdo a partir da avaliação do fluxo transmitral e da movimentação tecidual anular mitral dos coelhos dos grupos G1, G2, G3 e G4 durante protocolo de indução de cardiomiopatia por doxorubicina. Unesp, Jaboticabal, SP (2016).	54
<b>Tabela 7.</b>	Percentual de área de fibrose no tecido cardíaco dos coelhos do GC, G1, G2, G3 e G4 durante protocolo de indução de cardiomiopatia por doxorubicina. Unesp, Jaboticabal, SP (2016).	59

## LISTA DE FIGURAS

		<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b>	Representação esquemática do cronograma e protocolo experimental. Unesp, Jaboticabal, SP (2016).	35
<b>Figura 2.</b>	Ilustração da aplicação de manobra vagal em coelho para separação das ondas E e A do fluxo de enchimento do ventrículo esquerdo. Inicialmente, as ondas E e A estão fusionadas e indistinguíveis (A). Após aplicação de manobra vagal por compressão do plano nasal, as ondas E e A do fluxo transmitral apresentam-se separadas (B), permitindo a identificação e mensuração de cada uma isoladamente. Unesp, Jaboticabal, SP (2016).	38
<b>Figura 3.</b>	Traçados eletrocardiográficos obtidos de coelho do G2 durante protocolo de indução de cardiomiopatia por doxorrubicina (DII, 2N, 25mm/s). Observar a presença de ritmo sinusal nos momentos M0 (A), M1 (B) e M2 (C), e a ocorrência de arritmia sinusal nos momentos M3 (D) e M4 (E). Unesp, Jaboticabal, SP (2016).	48
<b>Figura 4.</b>	Traçado eletrocardiográfico obtido de coelho do G1 no M2 durante protocolo de indução de cardiomiopatia por doxorrubicina, ilustrando a presença de distúrbio de condução intraventricular nas derivações bipolares e unipolares aumentadas. Em DII, o quarto complexo QRS apresenta o distúrbio de condução. Unesp, Jaboticabal, SP (2016).	49
<b>Figura 5.</b>	Imagem ecocardiográfica apical quatro câmaras de coelho do G1 (grupo doxorrubicina), nos momentos M0 (A) e M4 (B). Unesp, Jaboticabal, SP (2016).	50
<b>Figura 6.</b>	Representação gráfica dos valores médios e desvios padrão da fração de encurtamento (%) do ventrículo esquerdo dos coelhos do G1, G2, G3 e G4 durante protocolo de indução de cardiomiopatia por doxorrubicina. Unesp, Jaboticabal, SP (2016).	51

	<b>Página</b>
<b>Figura 7.</b> Alterações macroscópicas presentes no coração de coelhos submetidos a tratamento com doxorubicina. (A) Cardiomegalia generalizada. Em destaque, observam-se átrio e ventrículo direitos expressivamente aumentados (setas). (B) Corte transversal ilustrando o aumento de diâmetro interno das câmaras ventriculares direita e esquerda. (C) Superfície de corte do pulmão com presença de líquido espumoso fluindo nas vias aéreas (seta). Unesp, Jaboticabal, SP (2016).	55
<b>Figura 8.</b> Alterações histopatológicas observadas no ventrículo esquerdo de coelhos tratados com doxorubicina. A: Fotomicrografia de ventrículo esquerdo de coelho do grupo doxorubicina (G1) ilustrando a ocorrência de necrose (setas) e vacuolização de cardiomiócitos (cabeças de setas). Hematoxilina e Eosina. Objetiva: 40x. Medianas e percentis dos graus de necrose (A1) e vacuolização (A2) de cardiomiócitos no ventrículo esquerdo de coelhos durante protocolo de indução de cardiomiopatia por doxorubicina. Unesp, Jaboticabal, SP (2016).	57
<b>Figura 9.</b> Fotomicrografias de ventrículo esquerdo de coelhos tratados com solução fisiológica ou doxorubicina. A: animal do grupo controle, apresentando proporção normal de tecido conjuntivo intersticial. B: animal do grupo doxorubicina (G1) apresentando área focalmente extensa de fibrose miocárdica. C: animal do grupo doxorubicina + carvedilol (G2), apresentando menor quantidade de tecido fibroso. Tricrômio de Masson. Objetiva: 40x. Unesp, Jaboticabal, SP (2016).	58
<b>Figura 10.</b> Fotomicrografias de ventrículo esquerdo de coelhos tratados com solução fisiológica ou doxorubicina. A: animal do grupo controle com ausência de marcação para células apoptóticas. B: animal do grupo doxorubicina (G1) com marcação citoplasmática positiva para caspase-3. Notar a presença de picnose nuclear (seta). C: animal do grupo doxorubicina + carvedilol (G2), apresentando menor número de células imunomarcadas. Método: Complexo de Polímeros ligados a peroxidase (Advance). Objetiva: 40x. Unesp, Jaboticabal, SP (2016).	60

	<b>Página</b>
<b>Figura 11.</b> Medianas e percentis do número de células imunomarcadas para caspase-3 no ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo (VE) dos coelhos durante protocolo de indução de cardiomiopatia por doxorubicina. Unesp, Jaboticabal, SP (2016).	61
<b>Figura 12.</b> Micrografia eletrônica de transmissão de ventrículo direito de coelhos tratados com solução fisiológica ou doxorubicina. A: Grupo controle. Presença de mitocôndrias interfibrilares dispostas em padrão colunar. A1: Aspecto digitiforme das cristas mitocondriais normais. A2: Aspecto normal dos sarcômeros, compostos pela banda I (a qual inclui a linha Z) e a banda A. B: Grupo doxorubicina. Perda do padrão colunar de distribuição mitocondrial. B1: Mitocôndrias apresentam-se tumefeitas. Notar a perda do aspecto digitiforme das cristas mitocondriais (*). B2: Presença de edema (E) e fragmentação de fibras musculares (cabeça de seta). Unesp, Jaboticabal, SP (2016).	63
<b>Figura 13.</b> Valores médios dos números de mitocôndrias normais e com lesão no ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo (VE) dos coelhos submetidos a protocolo de indução de cardiomiopatia por doxorubicina. Unesp, Jaboticabal, SP (2016).	64

## 1. INTRODUÇÃO

A doxorubicina é um antibiótico da classe das antraciclina amplamente utilizado no tratamento de neoplasias malignas. No entanto, seu emprego tem sido limitado em decorrência de seu potencial cardiotoxico, uma vez que pode induzir cardiomiopatia e insuficiência cardíaca congestiva refratária ao tratamento convencional. Dessa forma, a prevenção dos efeitos adversos cardiovasculares consiste em um ponto-chave quando de seu uso.

Em decorrência do grande impacto que a cardiomiopatia induzida pela doxorubicina exerce sobre a terapia oncológica, há mais de duas décadas o grupo de pesquisa em cardiologia veterinária da Unesp, câmpus de Jaboticabal, liderado pelo Prof. Dr. Aparecido Antonio Camacho, vem investigando os efeitos cardiotoxicos promovidos por esse agente antineoplásico (DAL FARRA et al., 1993; DAL FARRA et al., 1995; DIAS et al., 1997; NAKAGE et al., 1999; ANDRADE et al., 2003; SILVA et al., 2004; CAMACHO; ANDRADE, 2005; SILVA; CAMACHO, 2005; PEREIRA-NETO et al., 2006; SOUZA; CAMACHO, 2006; FERREIRA; SOUZA; CAMACHO, 2008). Tendo em vista a influência crescente de paradigmas éticos sobre o meio científico, a busca por modelos experimentais tornou-se essencial. Nos últimos anos, seu grupo de pesquisa tem investido na criação de um modelo experimental leporino para o estudo da cardiomiopatia induzida pela doxorubicina, que tem contribuído para a compreensão dos eventos que ocorrem durante o processo de instalação da cardiomiopatia induzida por esse fármaco, além da investigação dos mecanismos celulares envolvidos na sua gênese (GAVA et al., 2013; GAVA, 2014).

Em decorrência do crescente número de evidências da eficácia do emprego do carvedilol, da ciclosporina-A e do citrato de sildenafil na prevenção dos efeitos cardiotoxicos promovidos pela doxorubicina em seres humanos e em ratos, o modelo experimental com coelhos pode ser utilizado para o estudo *in vivo* da ação cardioprotetora desses fármacos. Este modelo também permite a avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos a fim de investigar a ocorrência de efeitos adversos quando do tratamento com esses fármacos em coelhos sob tratamento com doxorubicina. O uso de fármacos capazes de prevenir os efeitos cardiotoxicos promovidos pela doxorubicina poderá permitir explorar de maneira mais

intensa o potencial terapêutico desse agente antineoplásico, resultando em um grande e positivo impacto na terapia oncológica.

No presente estudo investigou-se a eficácia do carvedilol, da ciclosporina-A e do citrato de sildenafil na prevenção dos efeitos cardiotóxicos promovidos pela doxorrubicina em modelo experimental com coelhos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina

A doxorubicina é um antibiótico da classe das antraciclinas que pode ser isolado a partir de culturas fúngicas de *Streptomyces peucetis* var. *caesius* e tem sido amplamente utilizada em oncologia humana e veterinária (SUSANECK, 1983). Este fármaco é importante como parte do tratamento de diversas neoplasias malignas em pequenos animais, entre elas os linfomas (CHUN, 2009), osteossarcomas (CHUN; LORIMIER, 2003) e neoplasias mamárias (CASSALI et al., 2011), e encontra-se entre os agentes antineoplásico mais utilizados na prática oncológica de pequenos animais. Embora apresente excelente eficácia antineoplásica, seu uso pode ser limitado pela ocorrência de efeitos cardiotoxícos, que podem se manifestar como anormalidades eletrofisiológicas após aplicação única ou como cardiomiopatia induzida por doses cumulativas de doxorubicina (SIMUNEK et al., 2004; SOUZA; CAMACHO, 2006). Enquanto a primeira delas pode ser clinicamente controlável, a forma crônica e dose-dependente é a forma mais importante, uma vez que tem sido associada à indução de cardiomiopatia irreversível e insuficiência cardíaca congestiva (ZHOU et al., 2001; FISHER et al., 2005; MONTAIGNE et al., 2010; MARECHAL et al., 2011). Além disso, a doxorubicina pode ser utilizada como parte de protocolos que envolvem a associação com outros agentes com potencial cardiotoxíco sinérgico, tornando o miocárdio ainda mais susceptível. Por fim, como resultado do aumento da sobrevivência de pacientes com neoplasias malignas e da tendência ao uso frequente de doses cumulativas elevadas de doxorubicina, sua cardiotoxicidade encontra-se em evidência.

Acredita-se que os mecanismos celulares envolvidos na atividade antineoplásica da doxorubicina sejam distintos dos responsáveis pela indução de cardiomiopatia. Embora seu mecanismo de ação antitumoral ainda não seja completamente compreendido, considera-se que a doxorubicina seja capaz de se intercalar no DNA da célula tumoral afetando a síntese de ácidos nucleicos, além de ocasionar lesão no DNA e induzir apoptose pela sua interação com a topoisomerase-II (GERWIRTZ, 1999; TAKEMURA; FUJIWARA, 2007; CHATTERJEE et al., 2010).

Apesar de diversos mecanismos celulares terem sido propostos para explicar a cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina, o mecanismo exato e suas consequências metabólicas permanecem incertos. Entre os mecanismos responsáveis pela patogênese da agressão ao miocárdio, destacam-se o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial (GREEN; LEEUWENBURGH, 2002; SANTOS et al., 2002). Evidências bioquímicas e fisiológicas sugerem que a administração de doxorrubicina seja responsável pela formação de radicais livres, que estimulam a peroxidação lipídica, alteram a integridade da membrana celular e causam alteração no transporte de cálcio mitocondrial, resultando na morte de cardiomiócitos (DOROSHOW, 1983; SINGAL et al., 1987; ZHOU et al., 2001). Por muito tempo, destacou-se a importância da necrose como mecanismo responsável pela morte celular na cardiomiopatia induzida pela doxorrubicina. No entanto, um crescente número de evidências tem reconhecido a apoptose como mecanismo fundamental para a morte das células cardíacas diante da terapia antraciclínica (TAKEMURA; FUJIWARA, 2007; SIMUNEK et al., 2009).

O estresse oxidativo causado pela doxorrubicina nas mitocôndrias dos cardiomiócitos, associado ao desequilíbrio na homeostase do cálcio mitocondrial, leva à perda do potencial de membrana mitocondrial. Isso ocorre como consequência da abertura de um canal presente na membrana mitocondrial interna, o poro de transição da permeabilidade mitocondrial (MONTAIGNE et al., 2010; MARECHAL et al., 2011). Além da perda do potencial transmembrana mitocondrial, a permeabilização da membrana interna mitocondrial resulta no desacoplamento da cadeia respiratória e consequentemente redução da síntese de ATP, além de aumentar ainda mais a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Além disso, a abertura do poro de transição da permeabilidade mitocondrial permite que solutos de baixo peso molecular movam-se livremente para o interior da matriz mitocondrial, gerando um gradiente osmótico que, por sua vez, resulta em edema mitocondrial. A presença de cristas na membrana interna mitocondrial faz com que a mesma seja menos susceptível à ruptura. Sendo assim, a membrana externa se rompe, resultando na liberação de fatores pró-apoptóticos como o citocromo-c e o fator indutor de apoptose (FIA), culminando na ativação da via das caspases e morte celular por apoptose (SUSIN et al., 1999; HALESTRAP; CLARKE; JAVADOV, 2004; OLIVEIRA et al., 2004; BAINES,

2009). Entretanto, se o estresse ocasionado for severo ou demasiadamente prolongado, a depleção de ATP invariavelmente resultará em morte de cardiomiócitos por necrose (HALESTRAP; CLARKE; JAVADOV, 2004; BAINES, 2009).

Embora a morte celular por apoptose possa ser iniciada pela abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, ressalta-se que a via mitocondrial exerce papel crucial na ativação desse mecanismo de morte celular mesmo na ausência de abertura desse poro. Aliás, acredita-se que o principal evento mitocondrial para a morte celular por apoptose seja a permeabilização da membrana mitocondrial externa (KUNG; KONSTANTINIDIS; KITSIS, 2011). Embora o mecanismo bioquímico exato pelo qual a permeabilização dessa membrana ocorra não seja completamente conhecido, sabe-se que permite a liberação de fatores pró-apoptóticos do espaço intermembrana para o citoplasma, resultando na ativação da via das caspases e morte celular por apoptose pela via mitocondrial (HALESTRAP; MCSTAY; CLARKE, 2002). Sendo assim, ressalta-se que apesar dos efeitos cardiotoxícos promovidos pela doxorubicina serem amplamente estudados, diversos aspectos de sua patogênese permanecem obscuros, inclusive acerca dos mecanismos de morte celular resultantes.

O advento da microscopia eletrônica de transmissão teve papel crítico no reconhecimento da estrutura e função mitocondrial (FREY; MANNELLA, 2000). Por permitir avaliação do aspecto ultraestrutural dos cardiomiócitos, essa técnica tem sido de extrema importância para compreensão dos mecanismos envolvidos na patogenia da lesão tóxica decorrente do tratamento com doxorubicina, embora ainda haja um longo caminho a ser percorrido. De acordo com a gravidade das lesões, o dano mitocondrial pode variar desde discretas alterações no aspecto digitiforme das cristas mitocondriais, edema mitocondrial e formação de vacúolos, podendo culminar na perda completa das cristas mitocondriais (SCHWARZ et al., 1998; ASCENSÃO et al., 2006; LAI et al., 2011). Além do dano mitocondrial, vacuolização citoplasmática e fragmentação maciça com desarranjo de miofibrilas podem ser evidentes (TAKEMURA; FUJIWARA, 2007; AL-HARTHI et al., 2014).

As lesões miocárdicas decorrentes do tratamento crônico com doxorubicina podem ser visíveis à microscopia de luz, e caracterizam-se principalmente por vacuolização citoplasmática, desarranjo de miofibrilas, necrose de cardiomiócitos e

presença de áreas multifocais de fibrose intersticial (TAKEMURA; FUJUWARA, 2007; PONTES et al., 2010; LAI et al., 2011; KAWAGUCHI et al., 2012).

As alterações estruturais também podem influenciar o ritmo cardíaco, levando ao surgimento de arritmias, distúrbio de condução e supressão de milivoltagem da onda R (MAULDIN et al., 1992; PEREIRA NETO et al., 2006; SOUZA; CAMACHO, 2006). Utilizando-se da eletrocardiografia ambulatorial pelo sistema “Holter”, Pereira Neto et al. (2006) demonstraram a ocorrência de arritmias ventriculares e supraventriculares em cães tratados com doxorubicina, ressaltando a importância da avaliação do ritmo cardíaco em pacientes sob tratamento com essa antraciclina.

Nos últimos anos, grandes avanços do estudo ecodopplercardiográfico fizeram com que essa ferramenta se tornasse parte essencial da abordagem de excelência ao paciente cardiopata. O exame permite avaliação não-invasiva e não-ionizante do coração, oferecendo baixo risco ao paciente e equipe médica. Ao possibilitar o estudo do coração em tempo real, o exame ecodopplercardiográfico permite avaliação confiável da estrutura e função cardíaca (BOON, 2011), sendo em uma das principais ferramentas disponíveis para avaliação do sistema cardiovascular em animais sob tratamento com doxorubicina. Entre as principais alterações ecodopplercardiográficas descritas na cardiomiopatia induzida por doxorubicina, destacam-se a ocorrência de aumento de diâmetro e volume ventricular esquerdo, inicialmente em sístole e posteriormente em diástole, hipocinesia do septo e parede livre do ventrículo esquerdo e diminuição das frações de encurtamento e ejeção (SILVA; CAMACHO, 2005; GAVA et al., 2013). Com exceção do aumento do diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole, que representa aumento de pré-carga, as demais alterações ecocardiográficas descritas refletem a ocorrência de disfunção sistólica do ventrículo esquerdo (BOON, 2011).

Durante anos, na avaliação do sistema cardiovascular, enfatizou-se demasiadamente o estudo da função sistólica do ventrículo esquerdo, enquanto pouca atenção foi dada ao estudo detalhado da função diastólica. Em parte, isso se devia à limitação das ferramentas disponíveis para sua avaliação. Atualmente, sabe-se que o relaxamento miocárdico não é um processo passivo. O enchimento diastólico requer gasto energético e sua disfunção precede a disfunção sistólica em grande variedade de enfermidades cardíacas (DOUGHERTHY et al., 1984; GROSSMANN, 1990; ZILE;

BRUTSAERT, 2002), incluindo a cardiomiopatia induzida pela doxorubicina (BORENSTEIN et al., 2006; NEILAN et al., 2006; GAVA, 2014).

O estudo da função diastólica realizado com base exclusivamente nas ferramentas ecodopplercardiográficas convencionais, apresenta limitações importantes (BOON, 2011). No entanto, grandes avanços nos conhecimentos e ferramentas disponíveis para avaliação ecodopplercardiográfica tornaram possível avaliação mais acurada dessa função. O Doppler tecidual (TDI) é uma ferramenta ecocardiográfica que permite avaliar de forma quantitativa a movimentação miocárdica em sístole e diástole (BOON, 2011). A utilização do TDI, em comparação com a ecocardiografia bidimensional, proporciona melhor avaliação da função segmentar do miocárdio e garante maior acurácia na avaliação da função diastólica do coração (MCDICKEN et al., 1992). O estudo da movimentação tecidual do ânulo mitral permite a mensuração da velocidade tecidual sistólica (S), da velocidade tecidual na fase de enchimento rápido (E') e da sua velocidade na fase de contração atrial (A'). A velocidade tecidual na fase de enchimento rápido deve ser igual ou superior à sua velocidade na fase de contração atrial ( $E'/A' \geq 1$ ), enquanto a ocorrência de padrão invertido ( $E'/A' < 1$ ) indica disfunção diastólica do ventrículo esquerdo (BOON, 2011). Embora seja atualmente reconhecido que a disfunção diastólica desempenha um papel importante na patogenia da cardiomiopatia induzida pela doxorubicina, poucos foram os estudos que utilizaram a ferramenta do Doppler tecidual para avaliação cardíaca de animais em tratamento com doxorubicina (BORENSTEIN et al., 2006; NEILAN et al., 2006; GAVA, 2014).

O índice de performance miocárdica (ITEL) é outro parâmetro amplamente utilizado em ecodopplercardiografia e permite avaliação conjunta do desempenho sistólico e diastólico do ventrículo esquerdo (TEI et al., 1995). Por ser facilmente obtido pelo Doppler convencional e não sofrer influência da geometria ventricular, consiste em ferramenta extremamente útil na avaliação da função ventricular global em várias situações clínicas (AZZOLIN et al., 2006).

## 2.2 Prevenção dos efeitos cardiotoxícos induzidos pela doxorrubicina

Tendo em vista a refratariedade da cardiomiopatia induzida pela doxorrubicina, sua prevenção assume papel singular. Uma vez que os efeitos antineoplásicos e cardiotoxícos da doxorrubicina envolvem diferentes mecanismos de ação, é possível investigar uma abordagem terapêutica capaz de prevenir sua ação cardiotoxíca. Com esse propósito várias estratégias podem ser utilizadas, entre elas a limitação da dose cumulativa do quimioterápico; administração como parte de protocolos, alternando seu uso com o de outros agentes antineoplásicos, e assim aumentando o intervalo entre as aplicações de doxorrubicina; emprego da doxorrubicina encapsulada em lipossomos, e o tratamento com agentes antioxidantes (MYERS et al., 1983; UNVERFERTH et al., 1985; RAHMAN; YUSUF; EWER, 2007; SIMUNEK et al., 2009). No entanto, tais medidas apresentam eficácia limitada em prevenir os efeitos cardiotoxícos promovidos pela doxorrubicina, e a busca por estratégias mais eficazes se faz necessária.

Considerando-se a importância dos radicais livres na cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina, uma das alternativas para se reduzir tais efeitos deletérios consiste no emprego de varredores de radicais livres e fármacos com propriedades antioxidantes (SINGAL et al., 1987). No entanto, alguns desses agentes como o probucol, amifostina e dexrazoxano apresentam uma série de desvantagens, entre elas a incapacidade de prevenir a mortalidade e perda de peso dos indivíduos sob tratamento com doxorrubicina, além da potencialização do seu efeito mielossupressor (FISHER et al., 2005). Considera-se esse aspecto de extrema relevância, uma vez que a ocorrência de efeitos tóxicos sinérgicos sobre o sistema hematopoiético, fígado ou rins poderia contraindicar o uso dessas interações medicamentosas na prática clínica. Ainda, é prudente destacar que o custo extremamente elevado do dexrazoxano tem limitado seu uso na prática da oncologia veterinária.

O carvedilol é um bloqueador beta-adrenérgico amplamente utilizado no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva, hipertensão arterial e infarto do miocárdio em seres humanos. Em medicina veterinária, poucos estudos têm avaliado seu potencial terapêutico em condições clínicas específicas, e faltam evidências acerca de sua eficácia (MARCONDES-SANTOS et al., 2007; OYAMA et al., 2007;

LEOMIL-NETO et al., 2011). Apesar de um fármaco bastante promissor em vista de seus efeitos benéficos demonstrados em seres humanos, o carvedilol é pouco utilizado em cães e gatos.

Por ser um bloqueador adrenérgico não-seletivo, o carvedilol também exerce ação vasodilatadora mediante bloqueio de receptores  $\alpha_1$ . Ainda, possui outras propriedades terapêuticas benéficas, como seu efeito antioxidante e varredor de radicais livres (KRAMER; WEGLIKI, 1996; MATSUI et al., 1999). Essas últimas características, que não são compartilhadas por outros fármacos com atividade  $\beta$ -bloqueadora, têm o potencial de remover radicais livres de oxigênio e prevenir a peroxidação lipídica nos cardiomiócitos, tornando seu emprego promissor na prevenção da enfermidade em estudo (YUE et al., 1992).

Estudos demonstraram ação cardioprotetora estrutural e funcional conferida pelo carvedilol em modelos experimentais murinos de cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina (MATSUI et al., 1999; SANTOS et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2004). Em estudo *in vitro* realizado com cardiomiócitos murinos, demonstrou-se que sua ação cardioprotetora pode ocorrer em decorrência da redução da liberação de radicais livres e da apoptose no miocárdio (SPALLAROSSA et al., 2004). Ainda, a redução da fração de encurtamento do ventrículo esquerdo, observada em ratos submetidos ao tratamento com doxorrubicina, não foi observada nos animais submetidos à terapia profilática com carvedilol (MATSUI et al., 1999).

O efeito cardioprotetor do carvedilol é atribuído à sua ação antioxidante, uma vez que benefícios não foram demonstrados quando o fármaco foi substituído por outros agentes  $\beta$ -bloqueadores que não apresentam essa propriedade (MATSUI et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2004). Em conjunto, esses achados sugerem que o tratamento com carvedilol pode proporcionar avanços clínicos significativos ao reduzir a disfunção mitocondrial dose-dependente e a cardiomiopatia que resulta do tratamento prolongado com doxorrubicina em pacientes oncológicos (SANTOS et al., 2002). No entanto, ainda são escassos os estudos que avaliaram os efeitos cardioprotetores do carvedilol durante o tratamento com antraciclina.

A ciclosporina-A, um agente inibidor da calcineurina, tem no tratamento de enfermidades imunomediadas sua principal indicação em medicina veterinária. Em relação à sua ação sobre o tecido cardíaco, estudos realizados em modelos

experimentais de hipóxia e reperfusão têm demonstrado uma ação protetora a partir da inibição da transição de permeabilidade mitocondrial (NAZARETH et al., 1991).

Considerando-se que o estresse oxidativo induzido pelo tratamento com doxorubicina resulta na permeabilização não-seletiva da membrana mitocondrial interna, com posterior transição da permeabilidade mitocondrial, acredita-se que a ciclosporina-A seja um fármaco promissor para a prevenção dos efeitos cardiotoxícos promovidos por este agente antineoplásico, em virtude de sua ação inibitória sobre a abertura desse poro (KOWALTOWSKI; CASTILHO; VERCESI, 2001),

A partir de preparados de miocárdio humano e murino, foi demonstrado que a adição de doses não-imunossupressoras de ciclosporina-A foi capaz de prevenir a disfunção mitocondrial e miocárdica induzida pela doxorubicina (MONTAIGNE et al., 2010; MONTAIGNE et al., 2011). De maneira semelhante, o tratamento com ciclosporina-A em modelo experimental com camundongos mostrou-se eficaz em evitar a perda do potencial de membrana e a disfunção sistólica (MARECHAL et al., 2011). Além da carência por estudos adicionais *in vivo* que avaliem a eficácia da ciclosporina-A em prevenir os efeitos cardiotoxícos induzidos pela doxorubicina, é de extrema importância avaliar se o tratamento com esse fármaco poderia potencializar os efeitos mielossupressores da doxorubicina, o que limitaria seu uso nos pacientes sob tratamento com esse agente antineoplásico.

Os agentes inibidores da fosfodiesterase-5 (PDE-5), como o sildenafil, tem no tratamento da hipertensão pulmonar sua principal aplicação terapêutica em medicina veterinária (BROWN; DAVISON; SLEEPER, 2010). Nos últimos anos, estudos têm demonstrado uma atividade cardioprotetora em uma variedade de condições experimentais, como a injúria miocárdica por isquemia/reperfusão, infarto agudo do miocárdio e cardiomiopatia induzida pela doxorubicina (KOKA; KUKREJA, 2010).

Os mecanismos exatos pelos quais os inibidores da PDE-5 exercem sua ação cardioprotetora ainda não são completamente conhecidos. Acredita-se que sua ação vasodilatadora poderia potencializar a liberação de mediadores endógenos com ação cardioprotetora, incluindo a adenosina e a bradicinina, que por sua vez estariam relacionadas à liberação de óxido nítrico induzido a partir da fosforilação endotelial da óxido nítrico-sintetase (FISHER et al., 2005).

Em estudos realizados em ratos submetidos a tratamento com doxorrubicina, o tratamento com tadalafil (KOKA et al., 2010) ou sildenafil (FISCHER et al., 2005) contribuiu para a melhora da função miocárdica e prevenção da ocorrência de apoptose de cardiomiócitos, a partir da ativação de mecanismos antioxidantes e anti-apoptóticos mitocondriais. De maneira interessante, foi demonstrado que o uso do sildenafil em ratos com neoplasias prostáticas submetidos à terapia com doxorrubicina não apenas evitou a redução dos índices ecocardiográficos de função sistólica, mas também resultou em um aumento da sua eficácia antineoplásica (DAS et al., 2010).

### 3. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo avaliar se a utilização do carvedilol, ciclosporina-A ou citrato de sildenafil pode conferir proteção miocárdica na cardiomiopatia induzida pela doxorrubicina em modelo experimental com coelhos.

#### 3.1 Objetivos específicos

- Comparar os índices ecodopplercardiográficos e achados eletrocardiográficos de coelhos submetidos a tratamento com doxorrubicina e à sua associação com carvedilol, ciclosporina-A e sildenafil.
- Obter resultados de exames hematológicos e bioquímicos séricos de coelhos submetidos a tratamento com doxorrubicina e à sua associação com carvedilol, ciclosporina-A e sildenafil, comparando os efeitos de cada tratamento sobre os parâmetros sanguíneos e biomarcadores de função hepática e renal, a fim de se avaliar a segurança do uso dessas interações medicamentosas.
- A partir de avaliação histopatológica, avaliar a ocorrência de necrose, vacuolização citoplasmática e fibrose no miocárdio de coelhos submetidos a tratamento com doxorrubicina e à sua associação com carvedilol, ciclosporina-A e sildenafil, seguida de comparações entre os grupos experimentais.
- Avaliar e comparar a imunodeteção de caspase-3 no tecido cardíaco de coelhos submetidos a protocolo de indução de cardiomiopatia por doxorrubicina e à sua associação com carvedilol, ciclosporina-A e sildenafil.
- A partir de estudo do tecido cardíaco por microscopia eletrônica de transmissão, avaliar a ocorrência de alterações ultraestruturais nos cardiomiócitos de coelhos submetidos a tratamento com doxorrubicina e à sua associação com carvedilol, ciclosporina-A e sildenafil, realizando comparações entre os grupos experimentais.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Cardiologia do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária “Prof. Joaquim Martins Ferreira”, no Departamento de Patologia Veterinária, no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal e no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

O experimento foi conduzido de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, tendo sua aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA, desta instituição de ensino superior, sob o protocolo de número 020383/13.

### 4.1. Animais e grupos experimentais

Foram utilizados 45 coelhos adultos, machos, da linhagem Botucatu, com peso entre 2,2 e 3,6Kg, provenientes do Setor de Cunicultura da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – Unesp, câmpus de Botucatu. Os coelhos foram mantidos em baias individuais com dimensões de 80cm x 100cm x 100cm e alimentados com ração comercial<sup>1</sup> e água *ad libitum*, além do fornecimento semanal de hortaliça folhosa<sup>2</sup>. Os animais utilizados não apresentaram sinais ecocardiográficos de doenças valvulares e/ou miocárdicas primárias, remodelamento cardíaco ou alterações no ritmo cardíaco.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente para compor quatro grupos experimentais, denominados: G1 (grupo doxorrubicina; n = 10), G2 (grupo doxorrubicina + carvedilol; n = 10), G3 (grupo doxorrubicina + ciclosporina-A; n = 10) e G4 (grupo doxorrubicina + citrato de sildenafil; n = 10). Cinco animais foram utilizados como controle (GC) para as avaliações histopatológicas, imunoistoquímicas e ultraestruturais do miocárdio.

---

<sup>1</sup> Ração Linha do Campo Coelhos, Presence® Nutrição Animal.

<sup>2</sup> Couve-de-folha (*Brassica oleracea* L.).

## 4.2. Indução de cardiomiopatia com doxorrubicina

A indução de cardiomiopatia por doxorrubicina foi realizada segundo protocolo previamente descrito (GAVA et al., 2013; GAVA, 2014). A diluição do fármaco<sup>3</sup> em solução fisiológica 0,9% estéril foi realizada em capela de fluxo laminar<sup>4</sup> própria para o manejo de agentes antineoplásicos, à concentração de 2mg/mL. O fármaco foi utilizado na dose de 1mg/Kg e, à dose calculada, adicionava-se solução fisiológica 0,9% de modo a perfazer um volume total de 20mL. Todo o manejo desse fármaco foi realizado com o uso de equipamentos de proteção individual (luvas, avental, gorro e máscara) durante sua diluição e administração aos animais.

Após tricotomia e antissepsia da região auricular, o acesso venoso era obtido a partir da implantação de “scalp”<sup>5</sup> n.º 23 na veia auricular, e o volume total de doxorrubicina era administrado em “bolus”, durante aproximadamente um minuto. Esse procedimento foi realizado sob contenção física em todos os animais, duas vezes por semana, durante seis semanas consecutivas (Figura 1), período suficiente para uma significativa redução da função miocárdica (GAVA et al., 2013). Os animais do grupo controle receberam 20mL de solução fisiológica pela via intravenosa, nos mesmos dias em que os demais animais receberam tratamento com doxorrubicina.

## 4.3. Protocolo terapêutico para prevenção da cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina

Adicionalmente à doxorrubicina, os animais dos grupos G2, G3 e G4 receberam diariamente fármacos que variaram de acordo com os diferentes grupos experimentais: os animais do G2 receberam Carvedilol<sup>6</sup>, os animais do G3 receberam Ciclosporina-A<sup>7</sup> e os animais do G4 receberam Citrato de Sildenafil<sup>8</sup>. As doses desses fármacos foram determinadas de acordo com estudos anteriores na espécie leporina (Carvedilol e Sildenafil) ou por extrapolação alométrica (Ciclosporina-A). Para os

---

<sup>3</sup> Doxorrubicina 50mg, Eurofarma®.

<sup>4</sup> Capela de Fluxo Laminar, Filtracom®.

<sup>5</sup> BD (Becton, Dickinson & Company).

<sup>6</sup> Coreg® 25mg, Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A.

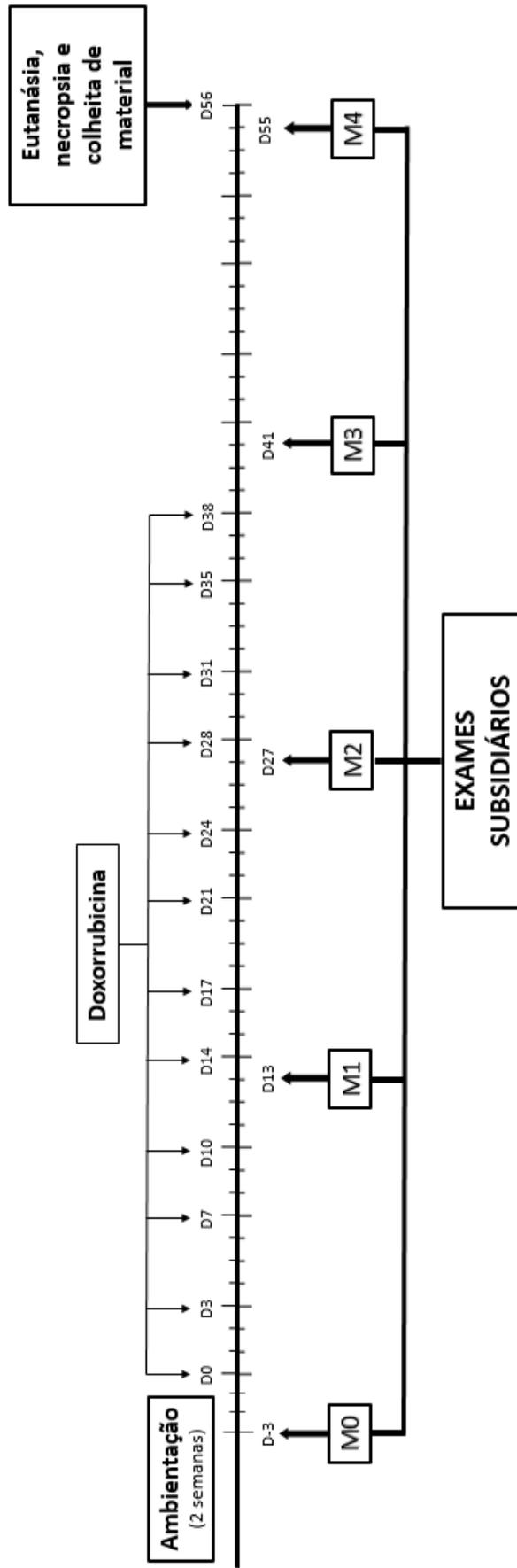
<sup>7</sup> Sandimmun Neoral® Suspensão 100mg/mL, Delpharm Huningue S.A.S.

<sup>8</sup> Viagra® 25mg, Laboratórios Pfizer Ltda.

animais tratados com Carvedilol, o mesmo foi administrado na dosagem de  $\frac{3}{4}$  de comprimido, o equivalente à dose aproximada de 5mg/Kg (LI et al., 2005; HE et al., 2012). A administração pela via oral foi realizada utilizando-se uma seringa plástica de 1ml cortada em sua extremidade, de modo que o comprimido fosse administrado em região mais aboral, próximo à base da língua, facilitando a deglutição do mesmo. A mesma técnica foi utilizada para a administração oral de Sildenafil ( $\frac{1}{4}$  de comprimido), o equivalente à dose aproximada de 1,8mg/Kg (OCKAILI et al., 2002; DAS et al., 2004). Por fim, a Ciclosporina-A (suspensão oral) foi administrada na dose de 4mg/Kg, com o auxílio de seringa plástica de 1ml. Essas medicações foram administradas a cada 24 horas, com início três dias antes da primeira aplicação de doxorubicina e término no dia 55 (um dia antes da eutanásia). Os fármacos foram administrados de modo que, nos dias em que os animais receberam aplicação de doxorubicina, esta foi administrada aproximadamente uma hora após a administração dos mesmos.

#### **4.4. Exames subsidiários**

Avaliações hematológicas, bioquímicas séricas, eletrocardiográficas e ecodopplercardiográficas foram realizados previamente a qualquer tratamento farmacológico e repetidas a cada 14 dias, em cinco momentos de avaliação, conforme ilustrado na Figura 1. Os animais que vieram a óbito antes da data prevista para a eutanásia foram submetidos a necropsia e avaliados macroscopicamente para confirmar o comprometimento cardíaco.



**Figura 1.** Representação esquemática do cronograma e protocolo experimental. Unesp, Jaboticabal, SP (2016).  
D-3 a D54: dias de estudo; M0 a M4: momentos de avaliação.

#### 4.4.1. Avaliação hematológica e bioquímica sérica

As amostras de sangue para realização de exames laboratoriais foram colhidas por venopunção jugular. Para realização de hemograma, dois mililitros de sangue foram colocados imediatamente em tubo com anticoagulante (ácido etilenodiaminotetracético – EDTA) e homogeneizados durante aproximadamente 30 segundos. As contagens de hemácias, hematócrito, hemoglobina, leucócitos e plaquetas foram realizados por método automático<sup>9</sup>, enquanto a avaliação diferencial de leucócitos foi realizada a partir de esfregaços sanguíneos corados pelo método de Rosenfeld e analisados sob microscopia de luz<sup>10</sup>.

Para realização dos exames de bioquímica sérica, aproximadamente cinco mililitros de sangue foram colocados em tubo sem anticoagulante, deixados repousar à temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos, em posição vertical. Após a colheita, o material foi mantido à temperatura ambiente até a coagulação e retração visível do coágulo, e então submetido à centrifugação a 3.000 rpm, durante dez minutos. Finalmente, as amostras séricas obtidas foram transferidas para microtubos com o auxílio de pipeta automática e congeladas imediatamente a -20°C, onde permaneceram armazenadas até o momento de seu processamento, por período máximo de quinze dias. As amostras foram utilizadas para determinação das concentrações séricas de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), uréia e creatinina.

#### 4.4.2. Avaliação eletrocardiográfica

A avaliação eletrocardiográfica foi realizada nas derivações bipolares I, II, III; unipolares aumentadas aVR, aVL e aVF e pré-cordiais rV2, V2, V4 e V10 em um eletrocardiógrafo computadorizado<sup>11</sup>. Durante a realização do exame, os animais foram mantidos em decúbito lateral direito, sob contenção física. Os traçados eletrocardiográficos tiveram duração de um minuto e foram analisados na derivação bipolar II (DII), na velocidade de 50 mm/segundo, sensibilidade 2N (1cm=2mV),

---

<sup>9</sup> Contador de Células ACT-8 Counter – Miami, EUA.

<sup>10</sup> Microscópio Nikon Eclipse – E 200 China.

<sup>11</sup> ECGPC Veterinário Versão 2.27 - Tecnologia Eletrônica Brasileira (TEB).

observando-se as características do ritmo cardíaco e os valores referentes à frequência cardíaca e duração dos intervalos PR e QT. A avaliação eletrocardiográfica foi realizada a cada 14 dias, iniciando-se previamente à primeira aplicação de doxorubicina.

#### **4.4.3. Avaliação ecodopplercardiográfica**

Os animais foram submetidos à avaliação ecodopplercardiográfica<sup>12</sup> com transdutor pediátrico multifrequencial 4 a 9MHz, a cada 14 dias (Figura 1). Os coelhos não foram submetidos à contenção química, conforme recomendado por Stypmann et al. (2007), a fim de evitar as influências dos agentes anestésicos nos resultados obtidos. Após a realização de tricotomia da região torácica direita e esquerda, os animais foram contidos em decúbito lateral para a realização do estudo ecodopplercardiográfico.

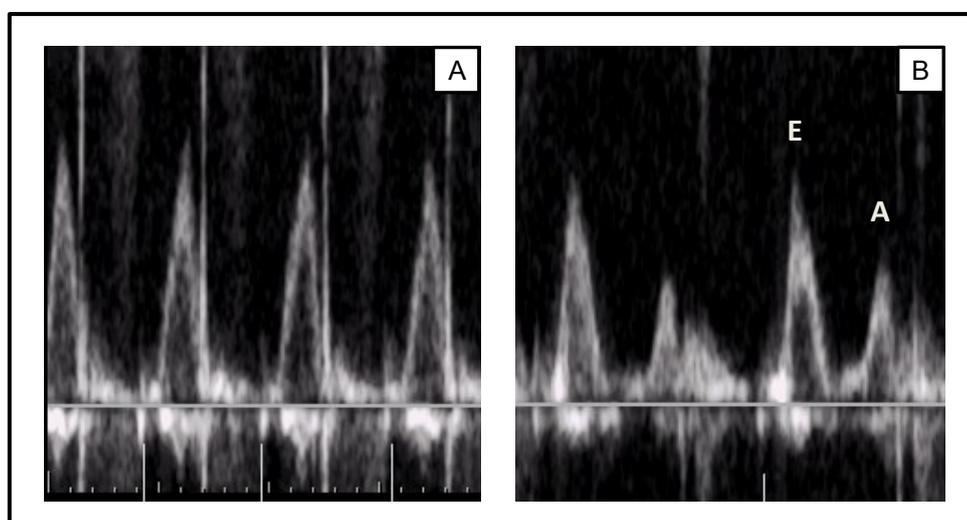
As avaliações compreenderam os modos bidimensional, modo-M, Doppler pulsado, contínuo, de fluxo em cores e tecidual. O acesso à janela paraesternal direita foi realizado com o animal posicionado em decúbito lateral direito. A partir da visualização do eixo transversal do ventrículo esquerdo em modo bidimensional, foi obtida a imagem em modo-M, no plano cordal, posicionando o cursor perpendicularmente ao septo interventricular e equidistante dos músculos papilares. A partir dessa imagem foram obtidos os seguintes parâmetros: espessura do septo interventricular em diástole (SIVd), diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole (DIVEd) e em sístole (DIVEs), espessura da parede livre do ventrículo esquerdo em diástole (PLVEd), fração de ejeção (FEJ) e fração de encurtamento (FEC) do ventrículo esquerdo pelo método de Teichholz (BOON, 2011). As fórmulas utilizadas para o cálculo dos últimos dois parâmetros encontram-se no Apêndice I.

Em seguida os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo. Para a obtenção do fluxo de enchimento do VE, a amostra de volume do Doppler pulsado foi posicionada na altura das bordas comissurais das cúspides da valva mitral aberta, e o filtro e ganho ajustados para o mínimo possível, compatível com a obtenção de uma boa imagem do espectro do fluxo. Nessa curva, foram analisados os picos de

---

<sup>12</sup> Acusom X300 Premium Edition, Siemens Healthcare.

velocidade da onda E (enchimento ventricular rápido) e da onda A (resultante da contração atrial) (BOON, 2011). Nos casos em que as ondas E e A apresentaram-se fusionadas, foi realizada estimulação vagal com o objetivo de reduzir a frequência cardíaca (ZACCHÉ et al., 2011) e permitir separação das respectivas ondas (SMITH; SCHOBBER, 2013), possibilitando sua mensuração. Essa manobra foi realizada por compressão digital sobre o plano nasal, incitando respiração forçada contra narinas parcialmente ocluídas, durante cinco a dez segundos, até promover separação das ondas em questão, conforme ilustrado na Figura 2 (ZACCHÉ et al., 2011).



**Figura 2.** Ilustração da aplicação de manobra vagal em coelho para separação das ondas E e A do fluxo de enchimento do ventrículo esquerdo. Inicialmente, as ondas E e A estão fusionadas e indistinguíveis (A). Após aplicação de manobra vagal por compressão do plano nasal, as ondas E e A do fluxo transmitral apresentam-se separadas (B), permitindo a identificação e mensuração de cada uma isoladamente. Unesp, Jaboticabal, SP (2016).

Para a mensuração do tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), o cursor do Doppler pulsado foi posicionado equidistante entre a via de saída do ventrículo esquerdo e o fluxo transmitral, sendo determinado o tempo desde o término do fluxo transaórtico até o início do enchimento ventricular rápido (onda E do fluxo transmitral).

Para o cálculo do índice de desempenho miocárdico de Tei (ITEI), foi mensurado o intervalo entre o término do espectro da onda A mitral e o início da onda

E mitral subsequente e desse valor subtraiu-se o tempo de ejeção do ventrículo esquerdo (TEVE). Posteriormente, o resultado obtido foi dividido pelo TEVE (TEI et al., 1995), conforme equação ilustrada nos Apêndices.

Para a análise da função diastólica, foram considerados o tempo de relaxamento isovolumétrico, o padrão de enchimento diastólico ventricular esquerdo e o padrão de relaxamento tecidual nos ânulos de inserção dos folhetos da válvula mitral. O estudo da movimentação tecidual anular mitral foi realizado pela ferramenta Doppler tecidual, a partir do corte apical quatro câmaras com amostra de volume posicionado à margens septal e lateral do anel mitral. Dessa forma foram obtidos os picos de velocidade tecidual nas fases de enchimento rápido do ventrículo esquerdo (E') e na fase de contração atrial (A'). À semelhança do que foi descrito para o fluxo mitral, nos casos em que as ondas E' e A' apresentaram-se fusionadas, foi realizada compressão nasal com o objetivo de reduzir a frequência cardíaca e permitir separação das respectivas ondas, permitindo sua mensuração.

Os resultados de todas as mensurações ecocardiográficas foram considerados a partir da média de três ciclos cardíacos consecutivos (BOON, 2011).

#### **4.5. Eutanásia e coleta de material**

No dia 56 os animais foram submetidos à eutanásia, de acordo com as Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, indicada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, câmpus de Jaboticabal, a partir da administração de propofol<sup>13</sup> seguido de cloreto de potássio<sup>14</sup>, ambos pela via intravenosa. Imediatamente, foram colhidos fragmentos dos ventrículos direito e esquerdo, fixados em solução de formol<sup>15</sup> a 10% tamponado com fosfatos, pH 7,6, e posteriormente utilizados para avaliação histopatológica e imunoistoquímica. Outros fragmentos dos ventrículos direito e esquerdo foram fixados em glutaraldeído<sup>16</sup> 3% por 3 horas a 4°C e, posteriormente, transferidos para solução de tampão fosfato 0,1M

---

<sup>13</sup> Propovan 10mg/mL, Cristália®

<sup>14</sup> Cloreto de Potássio 19,1%, Equiplax®

<sup>15</sup> Formaldeído P.A., Sinth®

<sup>16</sup> Glutaraldeído 25%, Merck®

a 4°C, para processamento e análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão, no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP.

#### **4.6. Avaliação histopatológica**

Para análise histológica, foram colhidos fragmentos dos ventrículos direito e esquerdo. Após 24 horas de fixação, os fragmentos foram desidratados em soluções de concentração decrescente de álcool, diafinizados em xilol e incluídos em parafina. Os cortes foram feitos na espessura de 5µm e corados com Hematoxilina e Eosina. As alterações microscópicas foram observadas de acordo com a intensidade de lesões degenerativas e foram graduadas em escores que variaram de 0 a 3, sendo:

- Grau 0: ausência de lesões
- Grau 1: intensidade discreta
- Grau 2: intensidade moderada
- Grau 3: intensidade acentuada

A análise das áreas de fibrose foi realizada a partir das lâminas coradas com Tricrômio de Masson. Três campos aleatórios foram fotografados com objetiva de 20x e posteriormente analisados no programa computacional Image-Pro® Plus<sup>17</sup>, a partir da determinação do percentual da área da imagem ocupada por tecido normal e do percentual da área ocupada por tecido conjuntivo.

#### **4.7. Avaliação imunoistoquímica**

A partir dos cortes de miocárdio incluídos em parafina, foi realizada a imunodeteção de células apoptóticas, por meio da técnica de imuno-histoquímica. As lâminas foram desparafinizadas em estufa 60°C por uma hora, seguida de dois banhos em xilol (10 minutos cada) e passagens em soluções de álcoois. Após a

---

<sup>17</sup> Image-Pro® Plus, Versão 4.5.0.29 for Windows.98/NT/2000.

desparafinização e banhos em álcool, todos os passos foram precedidos por lavagem em água deionizada e solução tampão Tris HCL (pH 7,4).

A recuperação antigênica foi realizada pelo calor, utilizando-se câmara de pressão Pascal<sup>18</sup> em solução tampão de citrato de sódio 10 mM (pH 6,0). O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com peróxido de hidrogênio 30 volumes, adicionado ao álcool metílico, com concentração final da solução de 8%, com incubação de 30 minutos. Em seguida, fez-se o bloqueio duplo de proteínas inespecíficas com produto comercial (Protein Block, DAKO, cód. X0909), por 30 minutos, à temperatura ambiente e com leite em pó<sup>19</sup> a 3,0% por 60 minutos. A incubação do anticorpo primário foi feita em temperatura ambiente (37°C) por 2 horas.

Para a imunodeteção de caspase, empregou-se o anticorpo caspase-3 clivada policlonal produzido em coelho (Biocare Medical, cód. CP229), na diluição de 1:1200. Como complexo secundário utilizaram-se polímeros ligados a peroxidase (Kit Advance HRP, Dako, cód. K4068), segundo protocolo do fabricante. Para a revelação da reação utilizou-se o cromógeno diaminobenzidina (DAB, Dako, cód. K3468), por três minutos por lâmina.

A contra coloração foi feita com Hematoxilina de Harris, por 30 segundos, com posterior lavagem em água corrente, seguida de desidratação em soluções crescentes de álcoois e xilol e montagem com Entellan (Merk, cód. HX888585). Como controle negativo optou-se por excluir o anticorpo primário da reação.

As lâminas foram fotografadas em cinco campos aleatórios, com objetiva de 40x. As imagens foram submetidas ao programa Micrometrics™ SE Premium<sup>20</sup> para contagem do número de células marcadas. O resultado final de cada lâmina foi obtido a partir do cálculo da média do número de células marcadas nas cinco imagens.

#### **4.8. Microscopia eletrônica de transmissão**

Após a lavagem com tampão fostato 0,1M a 4°C, o material destinado a microscopia eletrônica de transmissão foi pós-fixado em tetróxido de ósmio a 0,1% com tampão fostato 0,1M, pH 7,3 por 2 horas a 4°C. As amostras foram desidratadas

---

<sup>18</sup> Câmara de Pressão Pascal, DakoCytomation.

<sup>19</sup> Leite em pó Molico®

<sup>20</sup> Micrometrics™ SE Premium, versão 2.8

em uma sequência crescente de acetona: 30%, 50%, 70%, 90% e 95%, por 15 minutos (uma única vez) e a 100%, por 20 minutos (três vezes). O material foi infiltrado com resina araldite (1 parte de resina: 1 parte de acetona) à temperatura ambiente por 48 horas. Após esse procedimento, foi adicionado resina pura com os frascos abertos a 40° por 2 horas. A inclusão e polimerização foram realizadas a 60°C, por 72 horas. Após esse período, o material foi aparado realizando-se cortes de 0,5 µm de espessura, corados com azul de toluidina a 1% para observação em microscopia de luz. Por último, foram realizados os cortes ultrafinos (70nm) que foram contrastados com acetato de uranila saturado e citrato de chumbo. As grades contrastadas foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão e fotografadas com sistema digital, no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, câmpus de Jaboticabal, com o programa computacional Gatan Microscopy Suite<sup>21</sup>. Foram registradas três imagens de cada fragmento (VD e VE) por animal, em aumento de 15.000x, para contagem do número de mitocôndrias com e sem lesão. A contagem foi realizada empregando-se o programa *Micrometrics SE Premium*. O resultado final do número de mitocôndrias normais e com lesão em cada fragmento foi obtido a partir do cálculo da média das contagens nas três imagens.

#### 4.9. Análise estatística

Os dados obtidos a partir das avaliações hematológicas, bioquímicas séricas, eletrocardiográficas e ecodopplercardiográficas foram submetidos ao teste de normalidade dos resíduos Cramer-von Mises, com posterior análise de variância de duas vias (MANOVA) e então comparados entre os momentos de avaliação e entre os grupos experimentais pelo teste de Tukey-Kramer. O número médio de células com marcação positiva para caspase-3 também foi submetido ao teste de normalidade dos resíduos Cramer-von Mises, com posterior análise de variância (ANOVA) e por fim comparados entre os grupos experimentais pelo teste de Tukey-Kramer.

As proporções de animais com padrão normal ou invertido para as ondas E e A do fluxo transmitral e para as ondas E' e A' da movimentação anular mitral e as proporções de animais com ou sem distúrbio de condução intraventricular foram

---

<sup>21</sup> Gatan Microscopy Suite, Versão 2.30.542.0, Gatan Inc.

comparadas pelo teste exato de Fisher. O teste de qui-quadrado foi utilizado para comparar as proporções das áreas ocupadas por cardiomiócitos ou por tecido fibroso nas lâminas coradas com Tricrômico de Masson e para comparar as proporções dos números de mitocôndrias com ou sem lesão nas avaliações ultraestruturais.

Os escores das lesões degenerativas observados à avaliação histopatológica foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis com posterior comparação entre os grupos a partir do teste de Dunn.

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa SAS® (The SAS system for Windows, versão 9.00) e GraphPad Prism® (Prism 5 for Windows, versão 5.02 – GraphPad Software, Inc. 2008), sempre com nível de significância de 5%. Os animais que vieram a óbito antes da data prevista para a eutanásia foram excluídos das análises.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Mortalidade**

Em relação à mortalidade dos animais submetidos ao protocolo de indução de cardiomiopatia por doxorubicina, observou-se que até o dia 27 após o tratamento (M2), não foram observados óbitos dos animais. Entretanto, no momento M3, a mortalidade observada foi de 10% no G1 e 20% nos grupos G2, G3 e G4. E por fim, até o término do protocolo experimental (M4), 40% (n=4) dos animais vieram a óbito nos grupos G1 e G3 e 30% (n = 3) nos grupos G2 e G4.

### **5.2. Avaliação hematológica**

Com relação aos parâmetros eritrocitários avaliados, não foram observadas alterações significativas entre os diferentes momentos de avaliação (Tabela 1). Apesar de não significativa à luz da análise estatística, observou-se redução discreta do número de hemácias circulantes logo no primeiro momento de avaliação após início do tratamento com doxorubicina (M1), quando os animais apresentaram valores limítrofes ou mesmo abaixo dos valores de referência para a espécie leporina (Apêndices). Ao término do protocolo experimental, animais dos diferentes grupos experimentais apresentaram contagem média de eritrócitos abaixo dos valores de referência. Os valores de hematócrito sofreram redução em todos os grupos experimentais, embora redução significativa tenha sido observada apenas nos animais do G3 e G4. À semelhança do observado quanto à contagem de hemácias, valores mínimos de hematócrito foram observados no M3. Quanto à contagem de leucócitos, foram observadas alterações significativas ao longo do estudo apenas para os animais do G3 e G4. Os valores médios e desvios padrão das análises hematológicas são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Médias  $\pm$  desvios padrão dos parâmetros hematológicos dos coelhos dos grupos G1, G2, G3 e G4 durante protocolo de indução de cardiomiopatia por doxorrubicina. Unesp, Jaboticabal, SP (2016).

Parâmetros	Grupo	Momentos de avaliação				
		M0	M1	M2	M3	M4
Hemácias (L 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	G1	5,9 $\pm$ 0,3	5,2 $\pm$ 0,5	5,6 $\pm$ 0,3	5,2 $\pm$ 0,5	4,9 $\pm$ 0,5
	G2	5,6 $\pm$ 0,4	5,1 $\pm$ 0,7	5,5 $\pm$ 0,7	5,1 $\pm$ 0,8	4,9 $\pm$ 0,9
	G3	5,7 $\pm$ 0,4	5,1 $\pm$ 0,5	5,3 $\pm$ 0,3	4,8 $\pm$ 0,8	4,8 $\pm$ 0,5
	G4	5,9 $\pm$ 0,4a	5,1 $\pm$ 0,5ab	5,5 $\pm$ 0,6ab	5,3 $\pm$ 0,4ab	4,6 $\pm$ 0,7b
Hematócrito (%)	G1	38,2 $\pm$ 1,6	32,5 $\pm$ 3,3	32,9 $\pm$ 5,7	30,8 $\pm$ 3,2	31,8 $\pm$ 4,8
	G2	36,3 $\pm$ 2,7	31,9 $\pm$ 3,3	32,3 $\pm$ 3,6	29,7 $\pm$ 4,1	33,9 $\pm$ 5,8
	G3	36,1 $\pm$ 1,5a	31,5 $\pm$ 2,8ab	28,7 $\pm$ 6,7ab	27,8 $\pm$ 5,1b	31,7 $\pm$ 2,5ab
	G4	38,1 $\pm$ 1,9a	32,7 $\pm$ 1,8ab	34,8 $\pm$ 2,8ab	29,7 $\pm$ 5,2b	30,5 $\pm$ 4,3b
Hemoglobina (g/dL)	G1	11,8 $\pm$ 0,9	11,7 $\pm$ 0,9	12,0 $\pm$ 1,5	11,0 $\pm$ 1,0	11,6 $\pm$ 1,2
	G2	11,5 $\pm$ 0,8	10,9 $\pm$ 0,8	11,4 $\pm$ 1,4	11,3 $\pm$ 1,8	11,7 $\pm$ 1,6
	G3	11,6 $\pm$ 0,5	11,2 $\pm$ 1,2	9,8 $\pm$ 2,3	10,2 $\pm$ 1,7	11,2 $\pm$ 1,1
	G4	12,1 $\pm$ 0,6	12,1 $\pm$ 0,8	11,3 $\pm$ 1,3	10,7 $\pm$ 2,0	11,3 $\pm$ 1,2
Leucócitos (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	G1	5,9 $\pm$ 2,1	4,8 $\pm$ 2,5	4,6 $\pm$ 1,2	6,5 $\pm$ 2,9	5,1 $\pm$ 1,3
	G2	4,6 $\pm$ 1,4	3,9 $\pm$ 0,8	5,1 $\pm$ 1,3	6,0 $\pm$ 1,5	5,9 $\pm$ 2,4
	G3	4,7 $\pm$ 0,8ab	3,4 $\pm$ 0,4b	4,4 $\pm$ 2,4ab	6,0 $\pm$ 1,4ab	7,0 $\pm$ 2,1a
	G4	4,7 $\pm$ 0,6ab	4,3 $\pm$ 1,2b	3,9 $\pm$ 0,6b	6,2 $\pm$ 3,2ab	7,5 $\pm$ 2,6a
Plaquetas (L 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	G1	501 $\pm$ 90ab	326 $\pm$ 72bc	202 $\pm$ 74c	257 $\pm$ 111c	651 $\pm$ 106a
	G2	427 $\pm$ 147ab	420 $\pm$ 240ab	237 $\pm$ 89b	256 $\pm$ 70b	637 $\pm$ 229a
	G3	454 $\pm$ 102ab	271 $\pm$ 107bc	197 $\pm$ 76c	274 $\pm$ 81bc	668 $\pm$ 128a
	G4	456 $\pm$ 97b	326 $\pm$ 109bc	152 $\pm$ 32c	274 $\pm$ 57bc	701 $\pm$ 91a

GC: grupo controle; G1: grupo doxorrubicina; G2: grupo doxorrubicina + carvedilol; G3: grupo doxorrubicina + ciclosporina; G4: grupo doxorrubicina + sildenafil; M0 a M4: momentos de avaliação.

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na mesma linha não apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os momentos pelo teste de Tukey-Kramer.

Ao longo do protocolo de indução de cardiomiopatia com doxorrubicina, as variações da contagem de plaquetas foram semelhante nos diferentes grupos experimentais (Tabela 1). Inicialmente, observou-se redução não-significativa da contagem plaquetária, que atingiu valores mínimos e abaixo dos valores de referência no M2. No M4, quando os animais haviam ficado duas semanas sem tratamento com doxorrubicina, os valores atingiram níveis máximos em todos os grupos.

### 5.3. Bioquímica sérica

Os valores médios e desvio padrão obtidos a partir das análises de bioquímica sérica encontram-se na Tabela 2. Os níveis séricos de ALT sofreram alteração ao longo do protocolo experimental. Aumento inicial seguido de declínio não-significativo foi observado nos grupos experimentais, de modo que os menores valores foram observados entre os momentos M3 e M4. Quanto às concentrações séricas de AST, não foram observadas alterações significativas durante protocolo de indução de cardiomiopatia por doxorrubicina, exceto nos animais do G4.

**Tabela 2.** Médias  $\pm$  desvios padrão dos parâmetros de bioquímica sérica dos coelhos dos grupos G1, G2, G3 e G4 durante protocolo de indução de cardiomiopatia por doxorrubicina. Unesp, Jaboticabal, SP (2016).

Parâmetros	Grupo	Momentos de avaliação				
		M0	M1	M2	M3	M4
ALT (UI/L)	G1	47,5 $\pm$ 23,4ab	74,5 $\pm$ 44,3a	64,0 $\pm$ 23,1ab	35,3 $\pm$ 27,2b	45,5 $\pm$ 30,0ab
	G2	51,0 $\pm$ 11,8ab	62,1 $\pm$ 14,5a	59,4 $\pm$ 23,6ab	37,6 $\pm$ 20,3ab	28,6 $\pm$ 16,6b
	G3	56,2 $\pm$ 13,0ab	53,5 $\pm$ 19,6ab	75,3 $\pm$ 41,1a	37,8 $\pm$ 16,6b	29,5 $\pm$ 17,0b
	G4	60,7 $\pm$ 12,5ab	82,6 $\pm$ 15,3a	84,1 $\pm$ 21,9a	30,9 $\pm$ 16,2b	39,0 $\pm$ 15,3b
AST (UI/L)	G1	39,7 $\pm$ 22,9	36,2 $\pm$ 13,4	31,7 $\pm$ 6,2	30,0 $\pm$ 20,8	33,3 $\pm$ 19,3
	G2	35,3 $\pm$ 7,6	33,1 $\pm$ 12,0	33,3 $\pm$ 8,4	31,6 $\pm$ 10,4	25,6 $\pm$ 7,5
	G3	47,5 $\pm$ 13,2	36,3 $\pm$ 13,1	58,0 $\pm$ 31,7	33,3 $\pm$ 21,4	24,3 $\pm$ 9,5
	G4	39,9 $\pm$ 13,8ab	58,0 $\pm$ 27,7b	59,3 $\pm$ 24,1b	40,7 $\pm$ 32,8ab	23,1 $\pm$ 6,0a
Uréia (mg/dL)	G1	40,8 $\pm$ 3,4	45,3 $\pm$ 10,2	57,3 $\pm$ 7,4	41,5 $\pm$ 6,8	45,7 $\pm$ 9,4
	G2	44,4 $\pm$ 15,9	51,9 $\pm$ 12,2	53,9 $\pm$ 15,7	45,1 $\pm$ 16,4	47,2 $\pm$ 5,0
	G3	43,5 $\pm$ 7,2	39,2 $\pm$ 5,1	47,8 $\pm$ 13,8	41,7 $\pm$ 12,2	56,2 $\pm$ 17,7
	G4	49,6 $\pm$ 5,0ab	49,0 $\pm$ 6,5ab	60,3 $\pm$ 11,9a	42,1 $\pm$ 13,1b	49,3 $\pm$ 5,4ab
Creatinina (mg/dL)	G1	1,1 $\pm$ 0,1b	1,2 $\pm$ 0,2b	1,5 $\pm$ 0,3ab	1,6 $\pm$ 0,3a	1,2 $\pm$ 0,3b
	G2	1,1 $\pm$ 0,3	1,3 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,3	1,5 $\pm$ 0,3	1,3 $\pm$ 0,3
	G3	1,1 $\pm$ 0,1ab	1,3 $\pm$ 0,1ab	1,3 $\pm$ 0,2ab	1,5 $\pm$ 0,3a	1,0 $\pm$ 0,5b
	G4	1,0 $\pm$ 0,1b	1,2 $\pm$ 0,2ab	1,5 $\pm$ 0,2a	1,5 $\pm$ 0,2a	0,8 $\pm$ 0,5b

GC: grupo controle; G1: grupo doxorrubicina; G2: grupo doxorrubicina + carvedilol; G3: grupo doxorrubicina + ciclosporina; G4: grupo doxorrubicina + sildenafil; M0 a M4: momentos de avaliação; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase.

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na mesma linha não apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os momentos pelo teste de Tukey-Kramer.

Durante o protocolo experimental, não foram observadas alterações significativas das concentrações séricas de uréia. Com relação aos níveis de creatinina, foi observado aumento inicial com relação ao momento basal, nos

momentos M2 ou M3 (Tabela 2). No entanto, tais valores retornaram a níveis próximos basais no M4. Tais variações não foram observadas no G2, de modo que os valores de creatinina sérica não sofreram alterações significativas durante o estudo.

#### **5.4. Avaliação eletrocardiográfica**

Quanto ao ritmo cardíaco, não foram observadas alterações importantes ao longo do protocolo de indução de cardiomiopatia com doxorrubicina. Na maior parte das avaliações realizadas, os animais apresentaram ritmo sinusal, com raras exceções: duas delas em que um animal pertencente ao G2 apresentou arritmia sinusal como ritmo predominante em dois momentos de avaliação (Figura 3), e outra em que um animal do G3 também apresentou esse tipo de arritmia em avaliação realizada no M2.

Os valores médios e desvios padrão dos parâmetros eletrocardiográficos encontram-se na Tabela 3. Os valores de frequência cardíaca obtidos durante realização das avaliações eletrocardiográficas não demonstraram diferenças significativas entre os grupos, quando comparadas aos valores basais. Embora os animais do G2 tenham sido os que apresentaram os menores valores de frequência cardíaca em todas as avaliações obtidas durante tratamento com carvedilol, essa alteração não foi significativa à luz da análise estatística ( $p > 0,05$ ). Por fim, a frequência cardíaca observada nos animais do G4 no M3 apresentou-se mais elevada quando comparada à observada no M1.

Com relação às durações dos intervalos PR e QT, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ou entre os momentos de avaliação durante protocolo de indução de cardiomiopatia por doxorrubicina.

Em alguns dos traçados eletrocardiográficos obtidos, foram observados complexos QRS com morfologia sugestiva de distúrbio de condução intraventricular (Figura 4). Quando presente, o distúrbio foi observado em apenas um ou dois dos complexos QRS registrados durante o exame. Em todos os grupos de animais tratados com doxorrubicina, a alteração mostrou-se mais frequente à medida que se aumentava a dose cumulativa do fármaco (Tabela 4). Embora esse aumento não tenha ocorrido de forma significativa em nenhum dos grupos avaliados, ao realizar a



**Figura 3.** Traçados eletrocardiográficos obtidos de coelho do G2 durante protocolo de indução de cardiomiopatia por doxorubicina (DII, 2N, 25mm/s). Observar a presença de ritmo sinusal nos momentos M0 (A), M1 (B) e M2 (C), e a ocorrência de arritmia sinusal nos momentos M3 (D) e M4 (E). Unesp, Jaboticabal, SP (2016).

G2: grupo doxorubicina + carvedilol; DII: derivação bipolar II.

**Tabela 3.** Médias  $\pm$  desvios padrão dos parâmetros eletrocardiográficos dos coelhos dos grupos G1, G2, G3 e G4 durante protocolo de indução de cardiomiopatia por doxorubicina. Unesp, Jaboticabal, SP (2016).

Parâmetros	Grupo	Momentos de avaliação				
		M0	M1	M2	M3	M4
FC (bpm)	G1	279 $\pm$ 51	250 $\pm$ 24	272 $\pm$ 52	275 $\pm$ 38	281 $\pm$ 31
	G2	253 $\pm$ 33	215 $\pm$ 29	243 $\pm$ 45	241 $\pm$ 61	230 $\pm$ 36
	G3	229 $\pm$ 31	263 $\pm$ 35	281 $\pm$ 28	290 $\pm$ 30	251 $\pm$ 29
	G4	269 $\pm$ 37ab	232 $\pm$ 20b	255 $\pm$ 33ab	295 $\pm$ 29a	261 $\pm$ 19ab
Intervalo PR (ms)	G1	55,7 $\pm$ 11,5	54,0 $\pm$ 6,3	54,0 $\pm$ 8,3	54,5 $\pm$ 9,9	51,0 $\pm$ 6,4
	G2	48,6 $\pm$ 8,6	53,4 $\pm$ 7,9	54,1 $\pm$ 6,6	55,1 $\pm$ 9,0	50,7 $\pm$ 3,7
	G3	55,7 $\pm$ 7,8	52,2 $\pm$ 10,0	53,3 $\pm$ 4,7	51,8 $\pm$ 4,9	52,2 $\pm$ 8,5
	G4	53,3 $\pm$ 10,7	60,4 $\pm$ 7,8	55,9 $\pm$ 4,5	51,4 $\pm$ 6,3	58,1 $\pm$ 7,5
Intervalo QT (ms)	G1	149 $\pm$ 17	160 $\pm$ 15	157 $\pm$ 26	156 $\pm$ 17	155 $\pm$ 12
	G2	152 $\pm$ 9	175 $\pm$ 17	171 $\pm$ 17	172 $\pm$ 33	172 $\pm$ 21
	G3	156 $\pm$ 12	159 $\pm$ 15	151 $\pm$ 12	152 $\pm$ 13	160 $\pm$ 10
	G4	154 $\pm$ 11	161 $\pm$ 14	161 $\pm$ 8	152 $\pm$ 12	159 $\pm$ 13

GC: grupo controle; G1: grupo doxorubicina; G2: grupo doxorubicina + carvedilol; G3: grupo doxorubicina + ciclosporina; G4: grupo doxorubicina + sildenafil; M0 a M4: momentos de avaliação.

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na mesma linha não apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os momentos pelo teste de Tukey-Kramer.

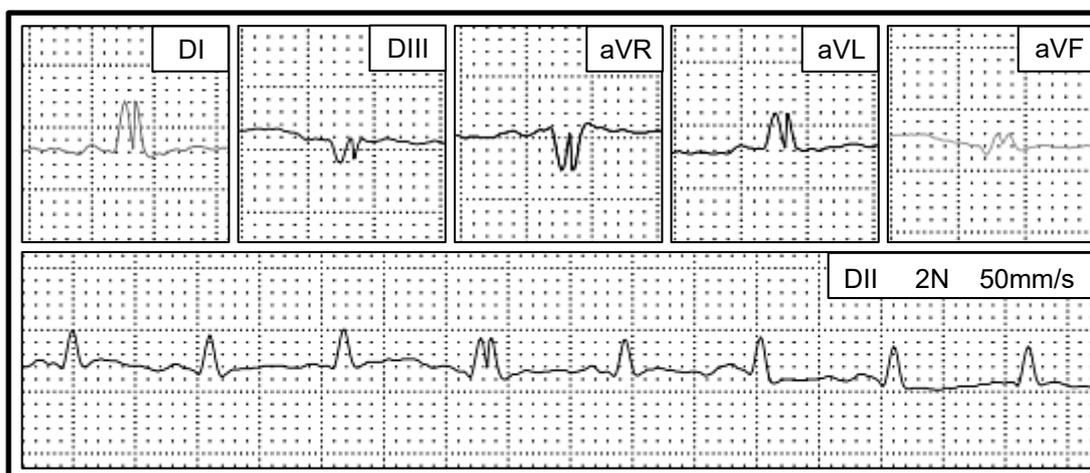
mesma avaliação considerando-se todos os animais tratados com doxorubicina, houve diferença significativa pelo teste exato de Fisher ( $p=0,003$ ), de modo que a ocorrência dessa alteração se mostrou mais frequente a partir do M3, quando comparado ao M0. Também não foram observadas diferenças entre a ocorrência desse distúrbio entre os grupos ( $p>0,05$ ).

**Tabela 4.** Percentual de coelhos com distúrbio de condução intraventricular nos grupos G1, G2, G3 e G4 durante protocolo de indução de cardiomiopatia por doxorubicina. Unesp, Jaboticabal, SP (2016).

Parâmetros	Grupo	Momentos de avaliação				
		M0	M1	M2	M3	M4
Presença de DCIV (%)	G1	16,7	33,3	16,7	66,7	50,0
	G2	0,0	0,0	42,9	28,6	42,9
	G3	0,0	16,7	16,7	50,0	50,0
	G4	14,3	0,0	0,0	14,3	42,9

GC: grupo controle; G1: grupo doxorubicina; G2: grupo doxorubicina + carvedilol; G3: grupo doxorubicina + ciclosporina; G4: grupo doxorubicina + sildenafil; M0 a M4: momentos de avaliação; DCIV: distúrbio de condução intraventricular.

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na mesma linha não apresentam diferença significativa ( $p<0,05$ ) entre os momentos pelo teste exato de Fisher.

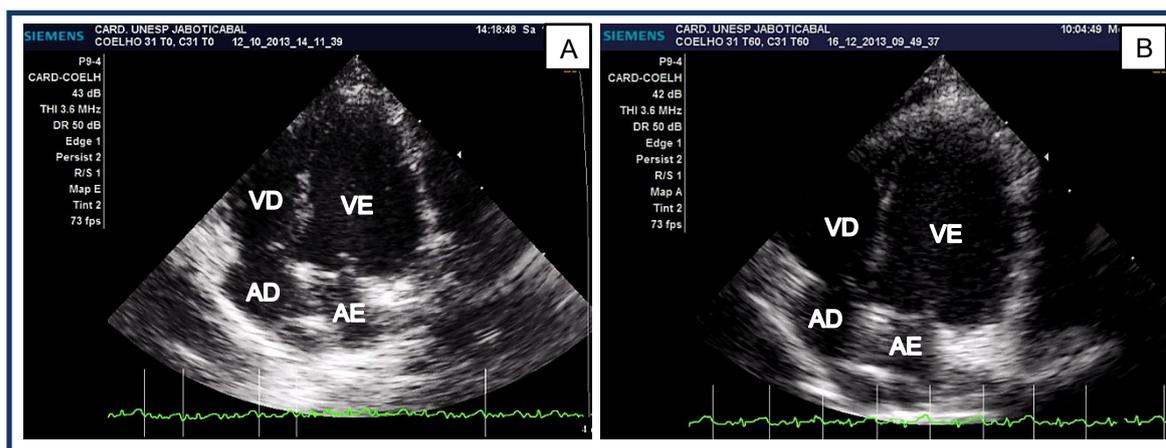


**Figura 4.** Traçado eletrocardiográfico obtido de coelho do G1 no M2 durante protocolo de indução de cardiomiopatia por doxorubicina, ilustrando a presença de distúrbio de condução intraventricular nas derivações bipolares e unipolares aumentadas. Em DII, o quarto complexo QRS apresenta o distúrbio de condução. Unesp, Jaboticabal, SP (2016).

G1: grupo doxorubicina. M2: momento 2 (dia 27).

### 5.5. Avaliação ecodopplercardiográfica

Ao final do protocolo de indução de cardiomiopatia por doxorubicina foi possível observar dilatação cardíaca generalizada em indivíduos de todos os grupos experimentais, mais evidente em câmaras ventriculares (Figura 5).

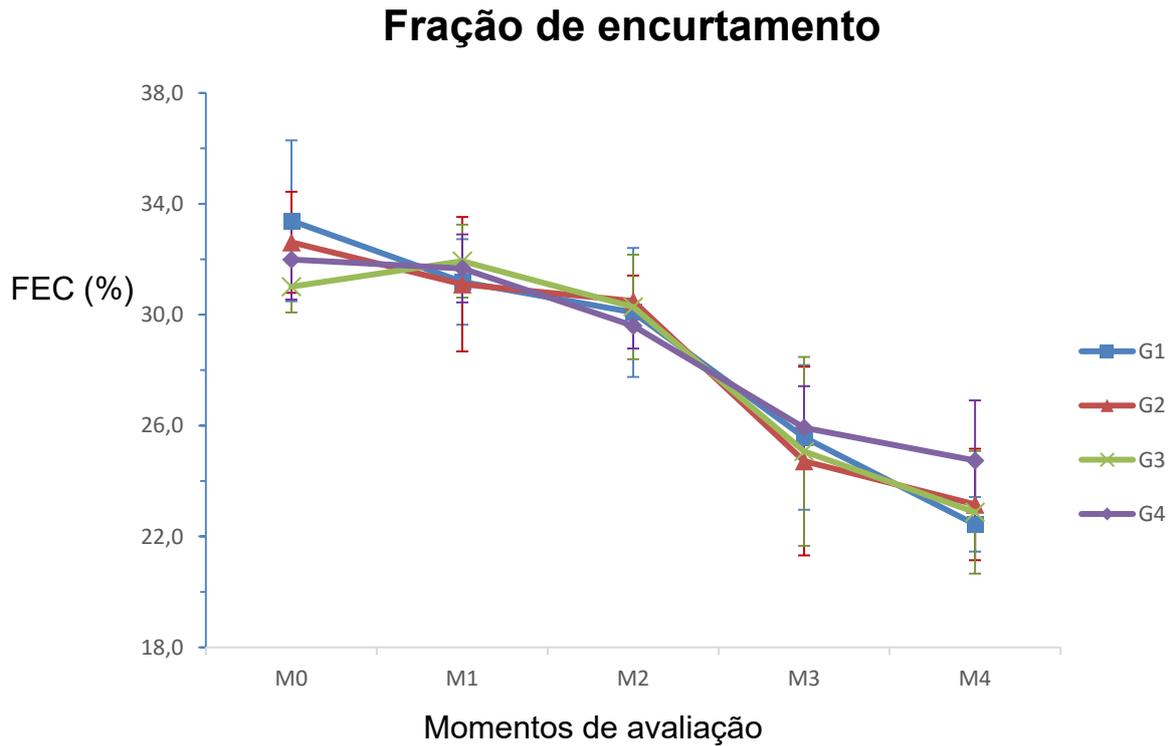


**Figura 5.** Imagem ecocardiográfica apical quatro câmaras de coelho do G1 (grupo doxorubicina), nos momentos M0 (A) e M4 (B). Unesp, Jaboticabal, SP (2016).

VD: ventrículo direito; VE: ventrículo esquerdo; AD: átrio direito; AE: átrio esquerdo.

Ao longo do tempo, foi possível identificar disfunção sistólica progressiva nos animais de todos os grupos experimentais, a partir da observação da redução dos valores de frações de encurtamento (Figura 6) e de ejeção. Os valores médios e desvios padrão dos parâmetros ecodopplercardiográficos encontram-se nas Tabelas 5 e 6.

Não foram observadas alterações significativas no diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole (DIVEd) entre os momentos de avaliação. No entanto, no M4 esses valores apresentaram-se maiores nos animais do G3 quando comparados aos do G1. Com relação ao seu diâmetro interno em sístole (DIVEs), apenas os valores obtidos a partir dos animais do G3 apresentaram-se elevados no M4, quando comparados aos valores observados nos momentos M0 a M2. Ainda, esses valores apresentaram-se maiores nos animais do G3 com relação ao G1, tanto no M3 como no M4 (Tabela 5).



**Figura 6.** Representação gráfica dos valores médios e desvios padrão da fração de encurtamento (%) do ventrículo esquerdo dos coelhos do G1, G2, G3 e G4 durante protocolo de indução de cardiomiopatia por doxorubicina. Unesp, Jaboticabal, SP (2016).

FEC: Fração de encurtamento; GC: grupo controle; G1: grupo doxorubicina; G2: grupo doxorubicina + carvedilol; G3: grupo doxorubicina + ciclosporina; G4: grupo doxorubicina + sildenafil; M0 a M4: momentos de avaliação.

Reduções nas frações de encurtamento e ejeção foram observadas nos momentos M3 e M4 quando comparadas aos momentos anteriores. No entanto, tais alterações se fizeram presentes em todos os grupos experimentais, de modo que não foram observadas alterações entre os grupos.

Não foram observadas alterações na relação átrio esquerdo/aorta, no tempo de ejeção do ventrículo esquerdo e nos valores de pico de velocidade de fluxo aórtico e pulmonar, tanto entre os grupos como entre os momentos de avaliação durante protocolo de indução de cardiomiopatia por doxorubicina.

Não foram observadas alterações no tempo de relaxamento isovolumétrico nos animais dos grupos G1 e G4. No entanto, nos animais dos grupos G2 e G3 esses valores apresentaram-se aumentados com relação ao momento basal, em diferentes

momentos de avaliação (Tabela 6). No entanto, não foram observadas alterações significativas entre os grupos experimentais.

Com relação ao índice de desempenho miocárdico de Tei (ITeI), não foram observadas alterações nos valores obtidos nas avaliações dos animais do G4. Nos animais dos demais grupos experimentais, esses valores sofreram aumento em diferentes momentos de avaliação (Tabela 6). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais ( $p > 0,05$ ).

A proporção de animais com relação E' por A' normal ( $E'/A' \geq 1$ ) por aqueles que apresentaram relação E' por A' anormal ( $E'/A' < 1$ ), ou seja, relação entre os animais com padrão normal de relaxamento por animais com padrão anormal (N/A), indicando disfunção diastólica do VE, apresentou comportamento semelhante nos ânulos mitral septal e lateral (Tabela 6). No ânulo lateral, foram observadas proporções menores de animais com padrão normal de movimentação miocárdica em diástole nos grupos G2 e G4 a partir do M2 quando comparados aos momentos anteriores, caracterizando um predomínio de animais com padrão de relaxamento anormal (disfunção diastólica). O mesmo foi observado nos animais dos grupos G1 e G3, porém apenas a partir do M3. Ainda, proporção de animais com padrão anormal de movimentação anular mitral lateral no M3 foi maior no G3 quando comparado ao G2.

Com relação à movimentação anular mitral septal, menor proporção de animais apresentaram padrão normal de movimentação miocárdica em diástole nos grupos G3 e G4 a partir do M2 quando comparados aos momentos anteriores. O mesmo foi observado nos animais do G1 a partir do M3 nos animais do grupo G2 no M4. Por fim, a proporção de animais com padrão anormal de movimentação anular mitral septal no M3 foi maior no G1 quando comparado ao G2.

**Tabela 5.** Médias  $\pm$  desvios padrão dos parâmetros ecocardiográficos dos coelhos dos grupos G1, G2, G3 e G4 durante protocolo de indução de cardiomiopatia por doxorubicina. Unesp, Jaboticabal, SP (2016).

Parâmetros	Grupo	Momentos de avaliação				
		M0	M1	M2	M3	M4
ESIVd (mm)	G1	2,3 $\pm$ 0,2	2,3 $\pm$ 0,4	2,3 $\pm$ 0,4	2,4 $\pm$ 0,4	2,5 $\pm$ 0,5
	G2	2,3 $\pm$ 0,3	2,4 $\pm$ 0,5	2,3 $\pm$ 0,4	2,5 $\pm$ 0,7	2,1 $\pm$ 0,2
	G3	2,2 $\pm$ 0,4	2,1 $\pm$ 0,2	2,2 $\pm$ 0,4	2,3 $\pm$ 0,2	2,1 $\pm$ 0,3
	G4	2,3 $\pm$ 0,4	2,4 $\pm$ 0,4	2,2 $\pm$ 0,5	2,1 $\pm$ 0,4	2,0 $\pm$ 0,3
DIVEd (mm)	G1	13,6 $\pm$ 0,8	12,7 $\pm$ 0,9B	13,0 $\pm$ 0,9	12,6 $\pm$ 1,2	13,2 $\pm$ 2,0B
	G2	14,4 $\pm$ 1,6	14,8 $\pm$ 1,0AB	14,6 $\pm$ 1,7	14,1 $\pm$ 1,6	14,5 $\pm$ 1,3AB
	G3	13,9 $\pm$ 1,9	14,3 $\pm$ 1,3AB	14,2 $\pm$ 1,1	14,0 $\pm$ 2,7	16,0 $\pm$ 2,9A
	G4	14,3 $\pm$ 0,7	15,4 $\pm$ 1,4A	14,6 $\pm$ 1,2	13,3 $\pm$ 1,7	14,8 $\pm$ 1,4AB
PLVEd (mm)	G1	2,0 $\pm$ 0,3	2,2 $\pm$ 0,1	2,2 $\pm$ 0,4	2,1 $\pm$ 0,3	2,1 $\pm$ 0,4
	G2	2,2 $\pm$ 0,2	2,4 $\pm$ 0,6	2,5 $\pm$ 0,6	2,3 $\pm$ 0,4	2,2 $\pm$ 0,4
	G3	2,1 $\pm$ 0,2	2,3 $\pm$ 0,4	2,1 $\pm$ 0,3	2,2 $\pm$ 0,3	2,3 $\pm$ 0,2
	G4	2,2 $\pm$ 0,3	2,2 $\pm$ 0,2	2,1 $\pm$ 0,2	2,1 $\pm$ 0,3	2,1 $\pm$ 0,4
DIVEs (mm)	G1	9,1 $\pm$ 0,6	8,8 $\pm$ 0,7	9,1 $\pm$ 0,7	9,4 $\pm$ 1,0	10,2 $\pm$ 1,6B
	G2	9,7 $\pm$ 1,2	10,2 $\pm$ 0,6	10,1 $\pm$ 1,3	10,6 $\pm$ 1,5	11,1 $\pm$ 1,1AB
	G3	9,6 $\pm$ 1,3	9,7 $\pm$ 1,0	9,9 $\pm$ 0,7	10,5 $\pm$ 2,3	12,4 $\pm$ 2,5A
	G4	9,7 $\pm$ 0,5	10,5 $\pm$ 0,9	10,3 $\pm$ 0,8	9,9 $\pm$ 1,3	11,2 $\pm$ 1,2AB
FEC (%)	G1	33,4 $\pm$ 2,9a	31,2 $\pm$ 1,5a	30,1 $\pm$ 2,3a	25,6 $\pm$ 2,6b	22,4 $\pm$ 1,0b
	G2	32,6 $\pm$ 1,8a	31,1 $\pm$ 2,4a	30,5 $\pm$ 0,9a	24,7 $\pm$ 3,4b	23,2 $\pm$ 2,0b
	G3	31,0 $\pm$ 0,9a	31,9 $\pm$ 1,3a	30,3 $\pm$ 1,9a	25,1 $\pm$ 3,4b	22,9 $\pm$ 2,2b
	G4	32,0 $\pm$ 1,4a	31,7 $\pm$ 1,2a	29,6 $\pm$ 0,8ab	25,9 $\pm$ 1,5bc	24,7 $\pm$ 2,2c
FEJ (%)	G1	66,2 $\pm$ 4,0a	63,6 $\pm$ 2,7a	62,7 $\pm$ 3,2a	55,1 $\pm$ 4,4b	50,3 $\pm$ 1,7b
	G2	65,0 $\pm$ 2,7a	63,2 $\pm$ 3,5a	62,3 $\pm$ 1,9a	53,1 $\pm$ 6,1b	50,2 $\pm$ 4,6b
	G3	62,6 $\pm$ 1,6a	64,6 $\pm$ 2,4a	62,1 $\pm$ 2,2a	53,5 $\pm$ 6,9b	49,3 $\pm$ 4,5b
	G4	64,3 $\pm$ 2,6a	63,3 $\pm$ 2,0a	60,6 $\pm$ 1,6ab	55,1 $\pm$ 3,0bc	52,6 $\pm$ 3,8c

GC: grupo controle; G1: grupo doxorubicina; G2: grupo doxorubicina + carvedilol; G3: grupo doxorubicina + ciclosporina; G4: grupo doxorubicina + sildenafil; M0 a M4: momentos de avaliação.

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na mesma linha não apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os momentos pelo teste de Tukey-Kramer.

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma coluna não indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos pelo teste de Tukey-Kramer.

**Tabela 6.** Médias  $\pm$  desvios padrão de parâmetros ecocardiográficos e percentual de animais com padrão normal de relaxamento ventricular esquerdo a partir da avaliação do fluxo transmitral e da movimentação tecidual anular mitral dos coelhos dos grupos G1, G2, G3 e G4 durante protocolo de indução de cardiomiopatia por doxorubicina. Unesp, Jaboticabal, SP (2016).

Parâmetros	Grupo	Momentos de avaliação				
		M0	M1	M2	M3	M4
ITEI	G1	0,24 $\pm$ 0,06b	0,24 $\pm$ 0,06b	0,32 $\pm$ 0,05ab	0,33 $\pm$ 0,04ab	0,35 $\pm$ 0,08a
	G2	0,22 $\pm$ 0,02c	0,26 $\pm$ 0,07bc	0,32 $\pm$ 0,04ab	0,32 $\pm$ 0,04abc	0,36 $\pm$ 0,05a
	G3	0,25 $\pm$ 0,05b	0,27 $\pm$ 0,02ab	0,29 $\pm$ 0,03ab	0,36 $\pm$ 0,06a	0,36 $\pm$ 0,08a
	G4	0,26 $\pm$ 0,05	0,24 $\pm$ 0,03	0,31 $\pm$ 0,03	0,32 $\pm$ 0,04	0,32 $\pm$ 0,05
TRIV (ms)	G1	24,7 $\pm$ 4,1	25,3 $\pm$ 5,6	28,7 $\pm$ 1,6	30,5 $\pm$ 4,5	32,0 $\pm$ 4,3
	G2	25,4 $\pm$ 3,6c	27,9 $\pm$ 4,7bc	33,0 $\pm$ 5,4abc	34,6 $\pm$ 5,7ab	38,1 $\pm$ 5,8a
	G3	24,3 $\pm$ 4,3b	31,5 $\pm$ 2,3ab	31,3 $\pm$ 4,3ab	34,0 $\pm$ 6,4ab	37,7 $\pm$ 10,9a
	G4	26,1 $\pm$ 2,0	26,3 $\pm$ 5,0	30,9 $\pm$ 4,1	32,1 $\pm$ 4,6	34,1 $\pm$ 4,7
E/A mitral normal (%)	G1	100,0	100,0	66,7	100,0	100,0A
	G2	100,0	100,0	85,7	85,7	71,4AB
	G3	100,0a	83,3ab	66,7ab	33,3ab	16,7Bb
	G4	100,0	100,0	42,9	71,4	42,9AB
E'/A' ânulo mitral lateral normal (%)	G1	100,0a	100,0a	100,0a	16,7ABb	33,3ab
	G2	100,0	100,0	71,4	71,4A	57,1
	G3	100,0a	83,3a	83,3a	0,0Bb	0,0b
	G4	100,0a	100,0a	42,9a	14,3ABb	28,6b
E'/A' ânulo mitral septal normal (%)	G1	100,0a	100,0a	83,3ab	16,7ABb	16,7b
	G2	100,0	100,0	71,4	71,4A	57,1
	G3	100,0a	83,3a	83,3a	0,0Bb	0,0b
	G4	100,0a	71,4ab	28,6b	14,3ABb	28,6b

ITEI: índice de desempenho miocárdico de Tei; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; GC: grupo controle; G1: grupo doxorubicina; G2: grupo doxorubicina + carvedilol; G3: grupo doxorubicina + ciclosporina; G4: grupo doxorubicina + sildenafil; M0 a M4: momentos de avaliação.

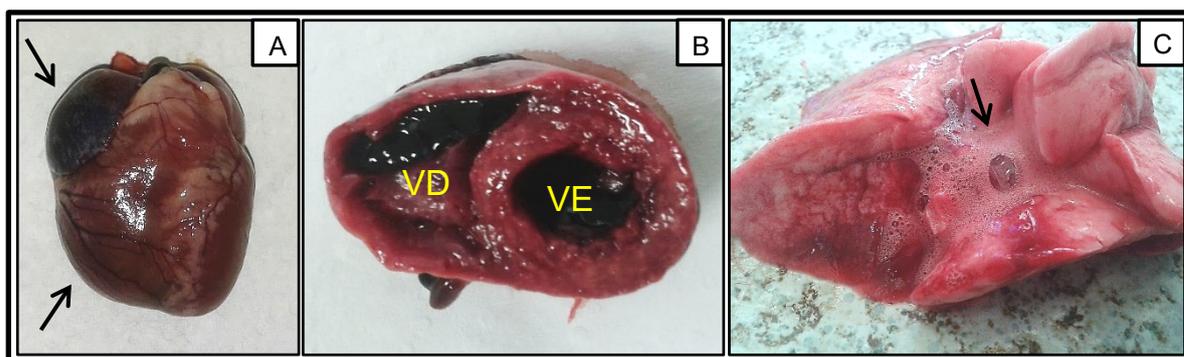
Médias seguidas de letras minúsculas iguais na mesma linha não apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os momentos pelo teste de Tukey-Kramer ou pelo teste exato de Fisher.

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma coluna não indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos pelo teste de Tukey-Kramer ou pelo teste exato de Fisher.

## 5.6. Avaliação macroscópica

Os animais de todos os grupos experimentais tratados com doxorubicina, inclusive aqueles que vieram a óbito antes da data prevista para a eutanásia, apresentaram alterações macroscópicas no coração, caracterizadas principalmente por cardiomegalia generalizada (Figura 7). Em alguns animais foi possível observar a ocorrência de insuficiência cardíaca congestiva esquerda ou bilateral, a partir da

observação de líquido espumoso fluindo a partir das vias aéreas, hepatomegalia, presença de efusão pericárdica, pleural e/ou ascite. Esses achados estiveram presentes em animais de todos os grupos experimentais submetidos ao protocolo de indução de cardiomiopatia por doxorrubicina.



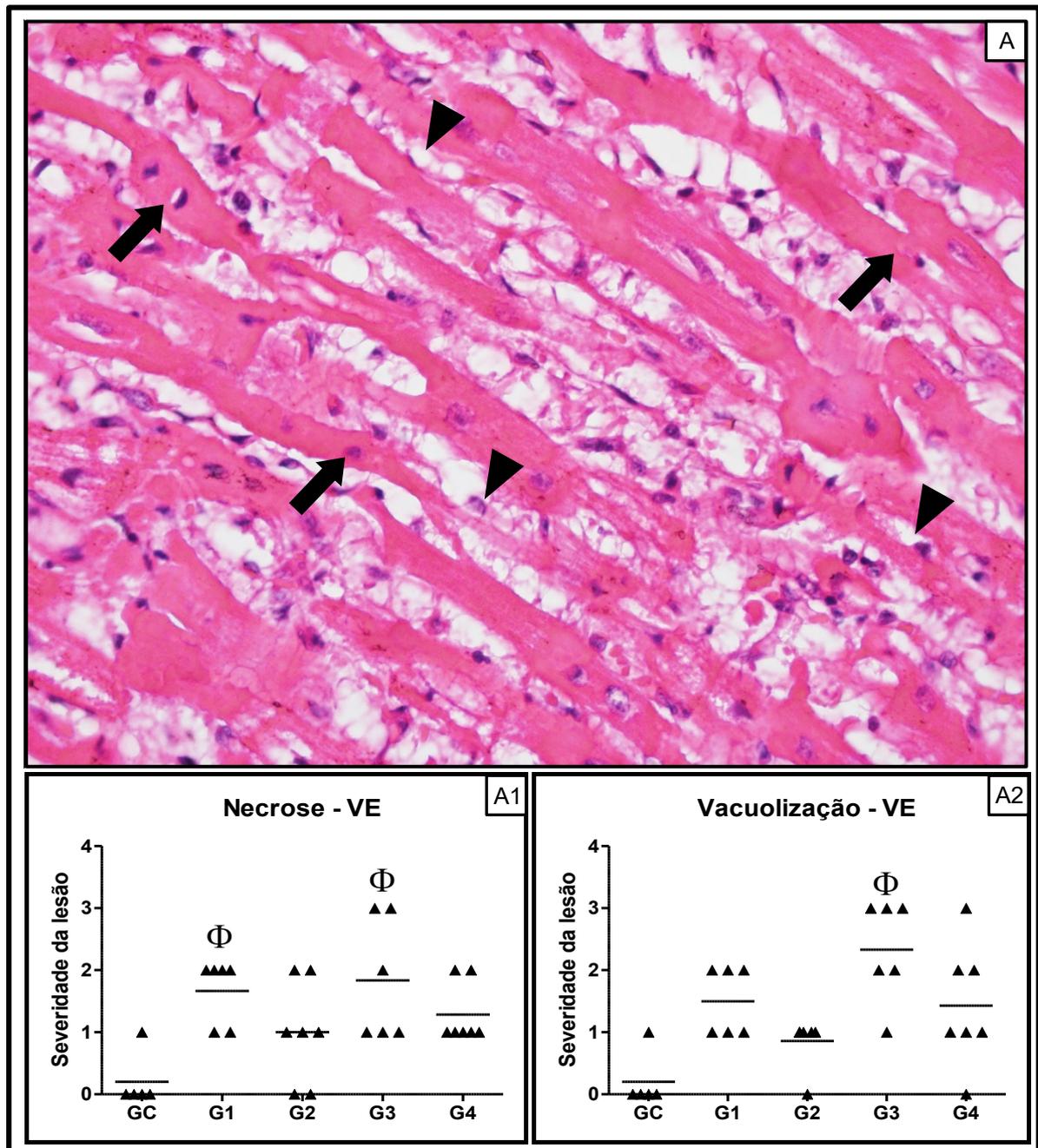
**Figura 7.** Alterações macroscópicas presentes no coração de coelhos submetidos a tratamento com doxorrubicina. (A) Cardiomegalia generalizada. Em destaque, observam-se átrio e ventrículo direitos expressivamente aumentados (setas). (B) Corte transversal ilustrando o aumento de diâmetro interno das câmaras ventriculares direita e esquerda. (C) Superfície de corte do pulmão com presença de líquido espumoso fluindo nas vias aéreas (seta). Unesp, Jaboticabal, SP (2016). VD: ventrículo direito; VE: ventrículo esquerdo.

### 5.7. Avaliação histopatológica

A avaliação histopatológica do miocárdio dos animais submetidos a tratamento com doxorrubicina (G1 a G4) revelou a ocorrência de vacuolização e necrose de cardiomiócitos em graus variáveis (Figura 8). De maneira geral, as lesões apresentaram-se mais severas no ventrículo direito que no esquerdo. Dois tipos de necrose de cardiomiócitos foram observados: necrose coagulativa e necrose em bandas de contração. Na presença da necrose coagulativa, os cardiomiócitos apresentavam-se acidófilos, com hiper cromasia nuclear e perda das estriações transversais (Figura 8-A), enquanto a necrose em bandas de contração caracterizou-se pela formação de múltiplas faixas ou bandas de material contrátil fragmentado, intensamente eosinofílicas e orientadas transversalmente.

A presença de vacúolos intracelulares foi visibilizada nos cardiomiócitos dos coelhos tratados com doxorrubicina (Figura 8-A). Não foram observadas diferenças nos graus de vacuolização e necrose de cardiomiócitos no ventrículo direito entre os diferentes grupos dos coelhos tratados com doxorrubicina. No entanto, a partir da avaliação dos fragmentos de ventrículo esquerdo, observou-se que os graus de severidade de necrose observados nos animais do G1 e G3 foram superiores aos observados no grupo controle (Figura 8-A1). Os animais do G3 também apresentaram maior grau de severidade de vacuolização citoplasmática (Figura 8-A2). Embora as alterações degenerativas também estivessem presentes nos animais do G2 e G4, não foram observadas diferenças quando comparadas aos animais do grupo controle. De maneira menos frequente, em alguns dos espécimes avaliados verificou-se ainda a presença de discreto infiltrado leucocitário, com predomínio de células mononucleares (linfócitos, macrófagos e plasmócitos).

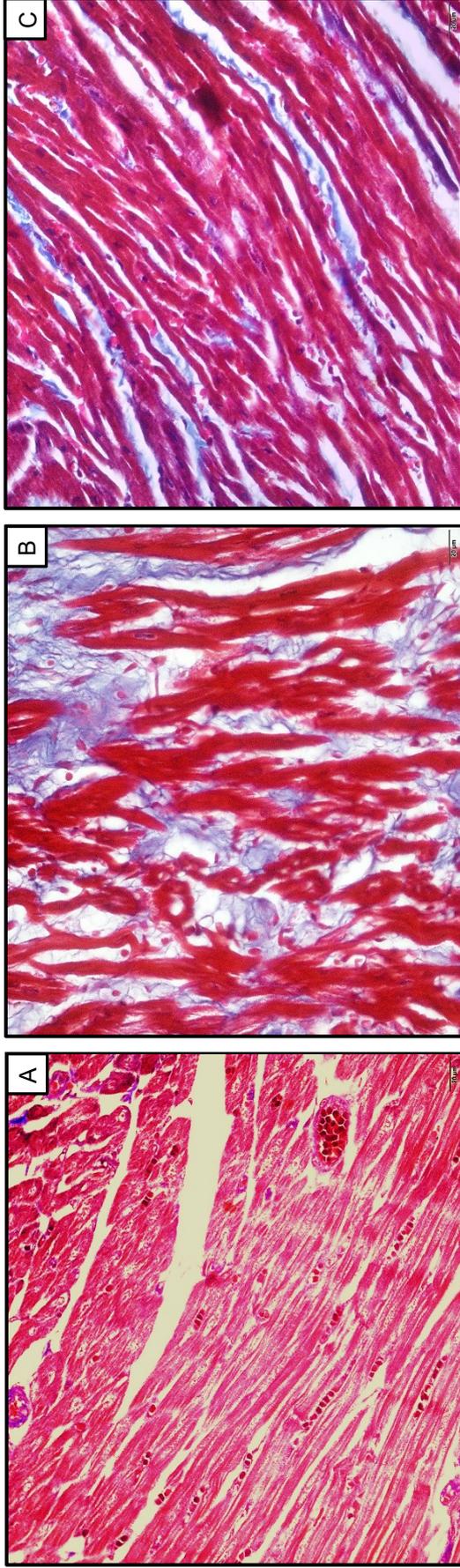
A avaliação dos cortes histológicos corados com Tricrômio de Masson revelou a ocorrência de aumento do tecido conjuntivo intersticial no miocárdio dos animais do G1, G3 e G4, quando comparados ao GC, sendo que o G2 foi o único grupo experimental onde não foi observado maior proporção de áreas de fibrose a partir das fotomicrografias avaliadas (Tabela 7). Ainda, os animais do G2 apresentaram menor área de tecido fibroso quando comparados aos animais do G1 (Figura 9).



**Figura 8.** Alterações histopatológicas observadas no ventrículo esquerdo de coelhos tratados com doxorubicina. A: Fotomicrografia de ventrículo esquerdo de coelho do grupo doxorubicina (G1) ilustrando a ocorrência de necrose (setas) e vacuolização de cardiomiócitos (cabeças de setas). Hematoxilina e Eosina. Objetiva: 40x. Medianas e percentis dos graus de necrose (A1) e vacuolização (A2) de cardiomiócitos no ventrículo esquerdo de coelhos durante protocolo de indução de cardiomiopatia por doxorubicina. Unesp, Jaboticabal, SP (2016).

GC: grupo controle; G1: grupo doxorubicina; G2: grupo doxorubicina + carvedilol; G3: grupo doxorubicina + ciclosporina; G4: grupo doxorubicina + sildenafil.

Φ Diferença significativa em relação ao grupo controle pelo teste de Dunn ( $p < 0,05$ ).



**Figura 9.** Fotomicrografias de ventrículo esquerdo de coelhos tratados com solução fisiológica ou doxorubicina. A: animal do grupo controle, apresentando proporção normal de tecido conjuntivo intersticial. B: animal do grupo doxorubicina (G1) apresentando área focalmente extensa de fibrose miocárdica. C: animal do grupo doxorubicina + carvedilol (G2), apresentando menor quantidade de tecido fibroso. Tricrômio de Masson. Objetiva: 40x. Unesp, Jaboticabal, SP (2016).

**Tabela 7.** Percentual de área de fibrose no tecido cardíaco dos coelhos do GC, G1, G2, G3 e G4 durante protocolo de indução de cardiomiopatia por doxorrubicina. Unesp, Jaboticabal, SP (2016).

Região	Grupo experimental				
	GC	G1	G2	G3	G4
VD (%)	5,0b	14,9a	10,8ab	13,0a	14,2a
VE (%)	3,0b	10,7a	8,3ab	15,3a	10,7a

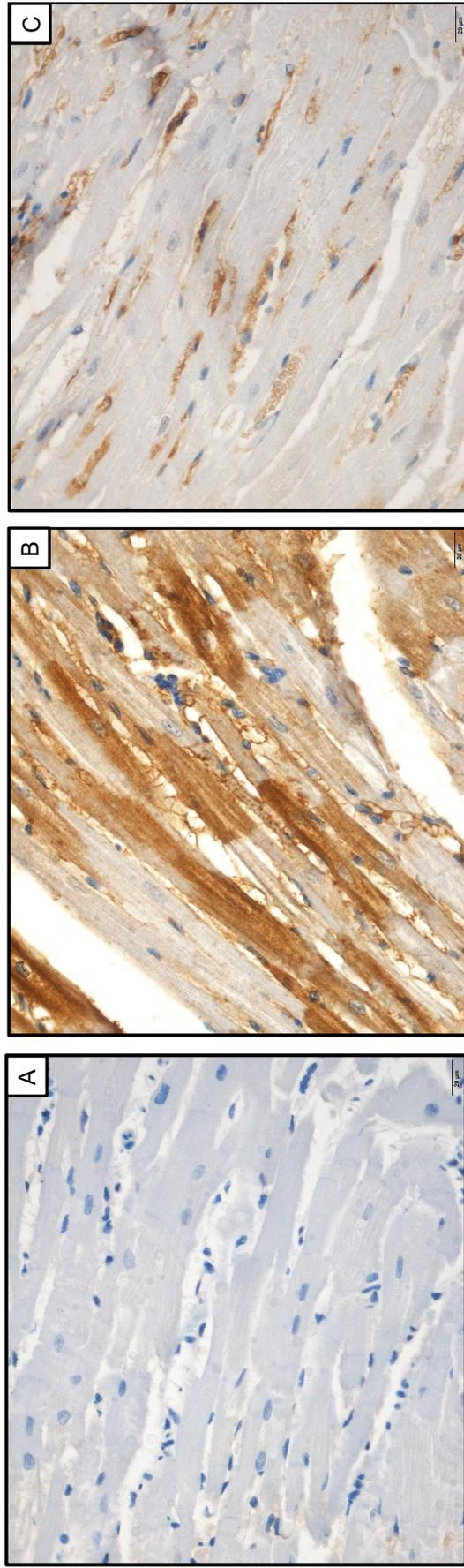
GC: grupo controle; G1: grupo doxorrubicina; G2: grupo doxorrubicina + carvedilol; G3: grupo doxorrubicina + ciclosporina; G4: grupo doxorrubicina + sildenafil; M0 a M4: momentos de avaliação.

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na mesma linha não apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os momentos pelo teste de qui-quadrado.

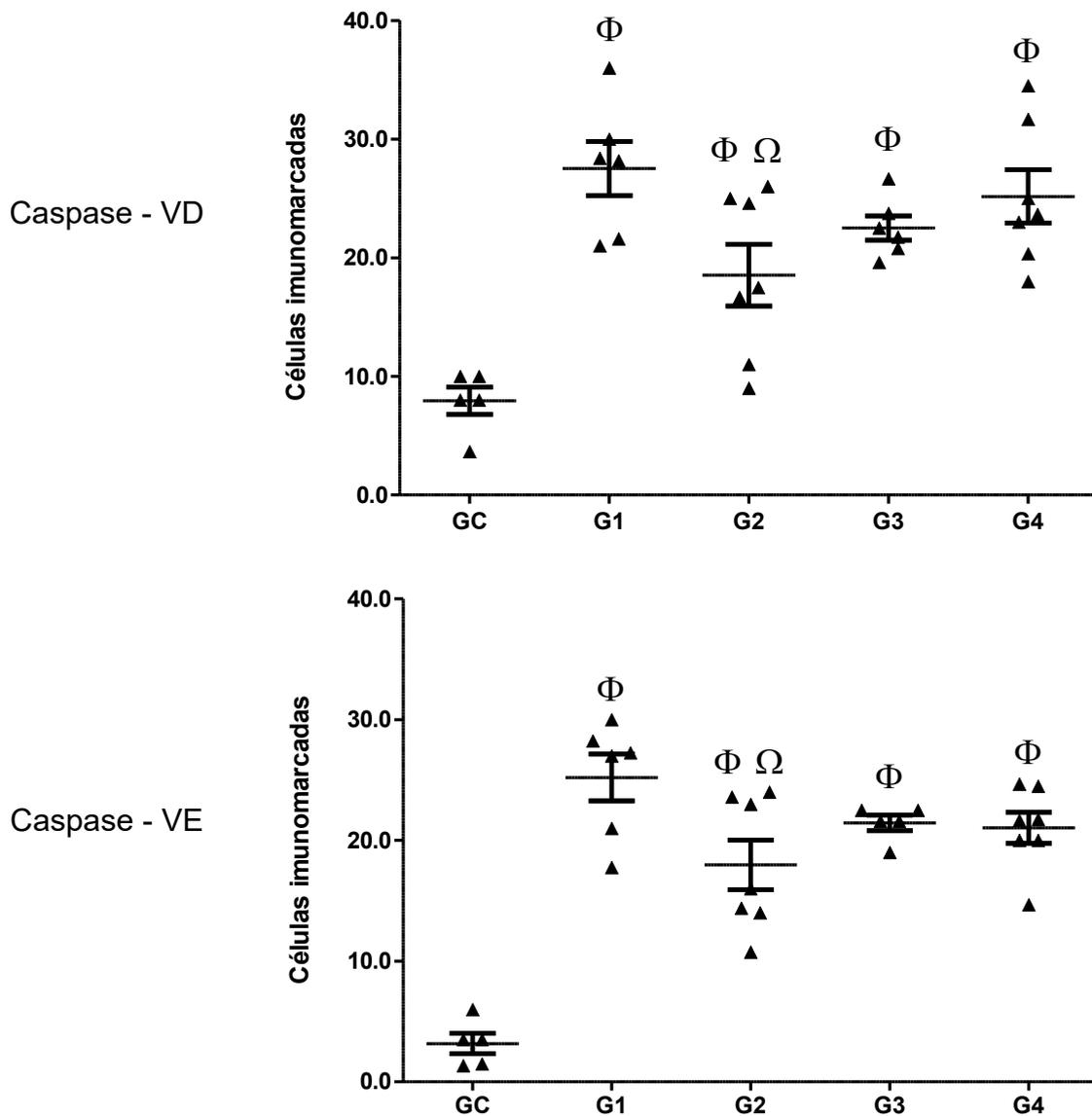
Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma coluna não indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos pelo teste de qui-quadrado.

### 5.8. Avaliação imunoistoquímica

A imunodeteção de caspase-3 revelou fibras com núcleos picnóticos e membrana citoplasmática íntegra, características da morte celular por apoptose (Figura 10). Tanto no ventrículo direito como no esquerdo, houve diferença significativa na contagem de células apoptóticas nos animais que receberam doxorrubicina (G1, G2, G3 e G4) em comparação com os animais do grupo controle ( $p < 0,05$ ). No entanto, os animais que receberam tratamento concomitante com carvedilol (G2), apresentaram menor número de células imunomarcadas em comparação aos animais do grupo G1, tratados exclusivamente com a antraciclina (Figura 11).



**Figura 10.** Fotomicrografias de ventrículo esquerdo de coelhos tratados com solução fisiológica ou doxorrubicina. A: animal do grupo controle com ausência de marcação para células apoptóticas. B: animal do grupo doxorrubicina (G1) com marcação citoplasmática positiva para caspase-3. Notar a presença de picnose nuclear (seta). C: animal do grupo doxorrubicina + carvedilol (G2), apresentando menor número de células imunomarcadas. Método: Complexo de Polímeros ligados a peroxidase (Advance). Objetiva: 40x. Unesp, Jaboticabal, SP (2016).



**Figura 11.** Medianas e percentis do número de células imunomarcadas para caspase-3 no ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo (VE) dos coelhos durante protocolo de indução de cardiomiopatia por doxorubicina. Unesp, Jaboticabal, SP (2016).

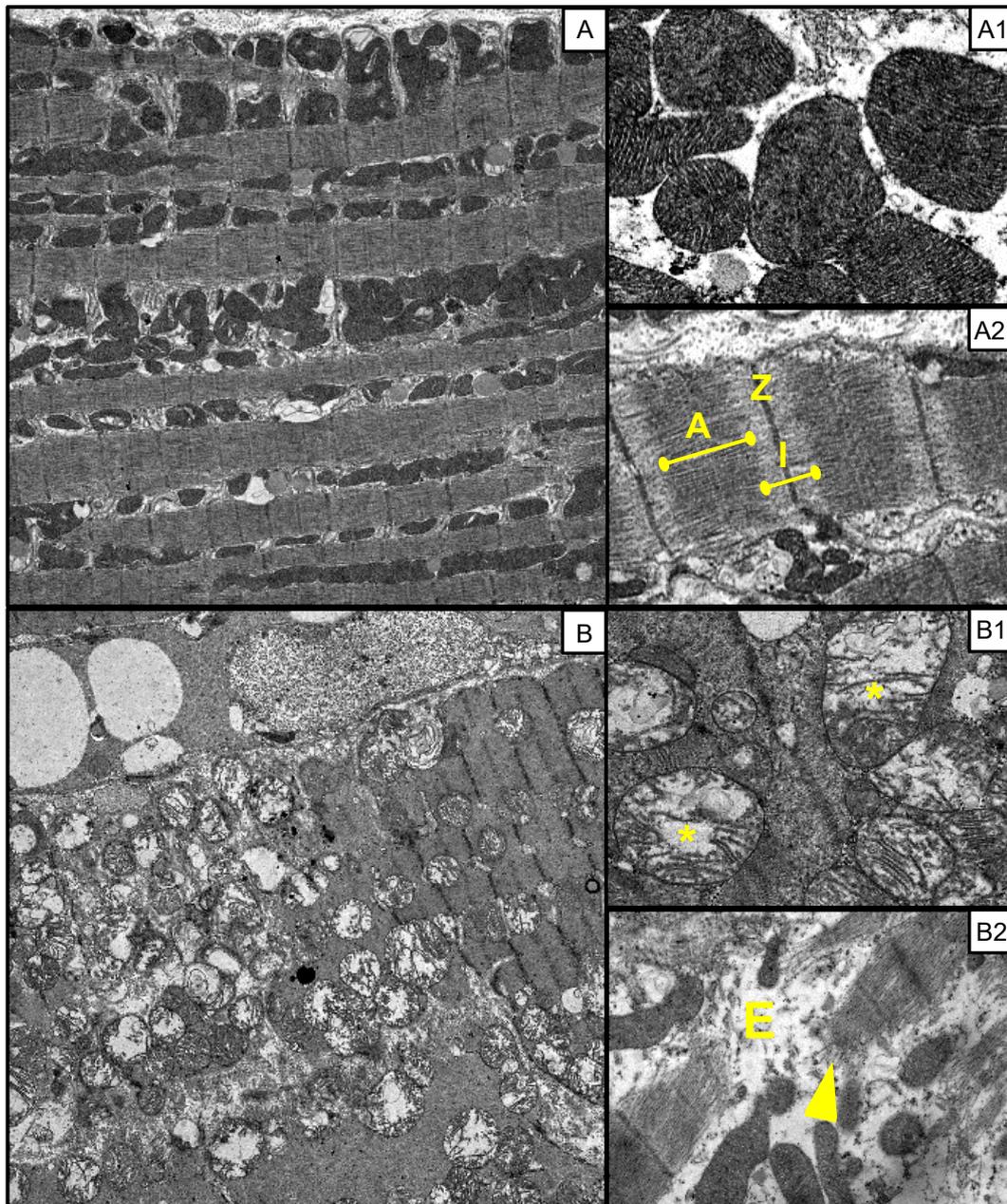
GC: grupo controle; G1: grupo doxorubicina; G2: grupo doxorubicina + carvedilol; G3: grupo doxorubicina + ciclosporina; G4: grupo doxorubicina + sildenafil.

Φ Diferença significativa em relação ao GC pelo teste de Tukey-Kramer ( $p < 0,05$ ).

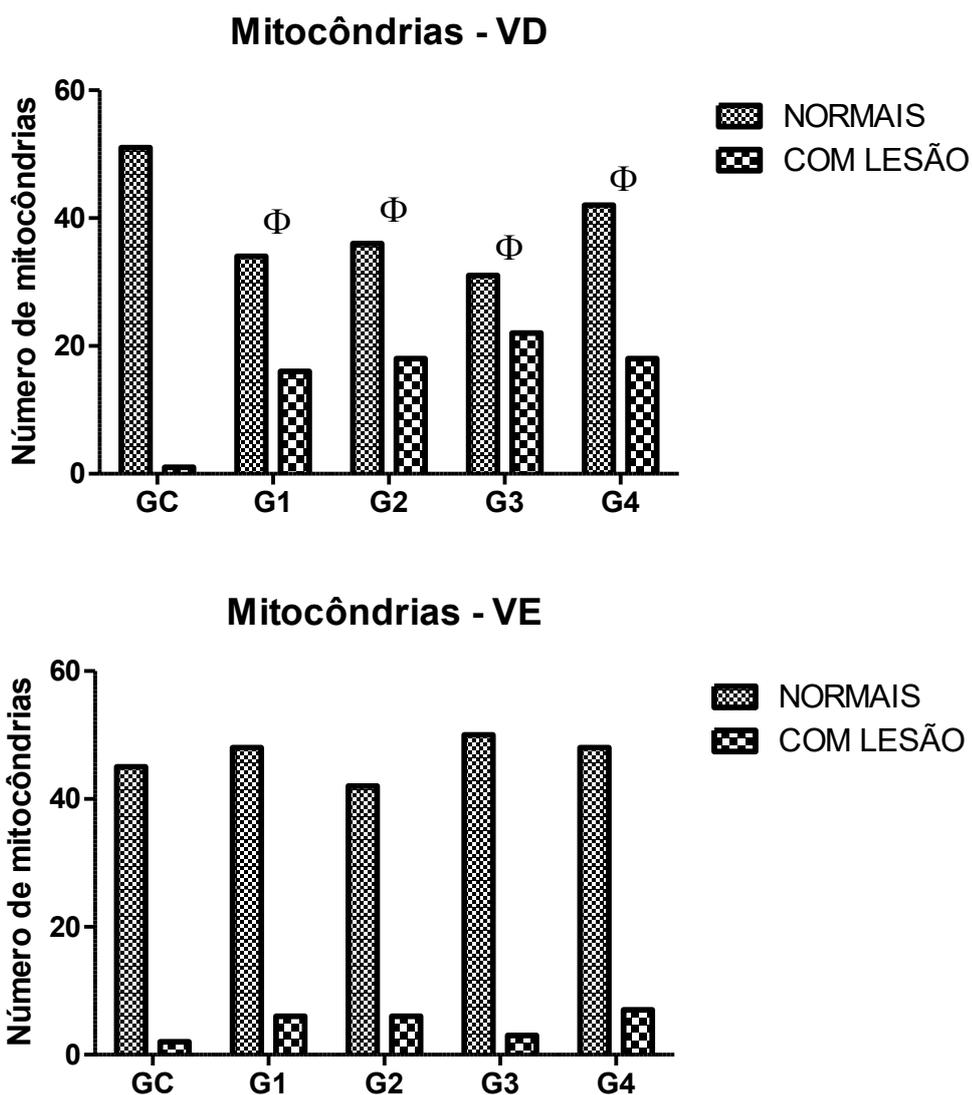
Ω Diferença significativa em relação ao G1 pelo teste de Tukey-Kramer ( $p < 0,05$ ).

### 5.9. Microscopia eletrônica de transmissão

As fibras musculares cardíacas dos animais do grupo controle apresentaram-se preservadas, conforme ilustrado na Figura 12-A. Em cortes longitudinais, foi possível identificar o aspecto digitiforme das cristas mitocondriais (Figura 12-A1), além da distribuição colunar destas organelas no sarcoplasma, dispostas de forma paralela ao comprimento das fibras cardíacas. Ainda nos cortes longitudinais, foi observado o aspecto normal dos sarcômeros, compostos pela banda I (a qual inclui a linha Z) e a banda A (Figura 12-A2). Nos animais tratados com doxorubicina algumas fibras musculares apresentaram-se fragmentadas (miocitólise), com presença de bandas de hipercontração, além de aumento da matriz extracelular (Figura 12-B). Essas alterações foram observadas de maneira semelhante entre os animais dos grupos G1 a G4. Outro aspecto importante foi o aumento do número das mitocôndrias com lesão que encontravam-se aglomeradas no sarcoplasma, tumefeitas e com perda do aspecto digitiforme de suas cristas, resultando na formação de grandes vacúolos (Figura 12-B1). Essa alteração apresentou-se mais pronunciada no ventrículo direito dos animais tratados com doxorubicina (G1, G2, G3 e G4), onde a proporção de mitocôndrias alteradas em relação às aquelas normais foi significativamente superior quando comparados aos animais do grupo controle (Figura 13). O mesmo não foi observado no ventrículo esquerdo, no qual não se verificou diferença entre a proporção de mitocôndrias com lesão com relação às normais quando comparou-se os diferentes grupos experimentais.



**Figura 12.** Micrografia eletrônica de transmissão de ventrículo direito de coelhos tratados com solução fisiológica ou doxorrubicina. A: Grupo controle. Presença de mitocôndrias interfibrilares dispostas em padrão colunar. A1: Aspecto digitiforme das cristas mitocondriais normais. A2: Aspecto normal dos sarcômeros, compostos pela banda I (a qual inclui a linha Z) e a banda A. B: Grupo doxorrubicina. Perda do padrão colunar de distribuição mitocondrial. B1: Mitocôndrias apresentam-se tumefeitas. Notar a perda do aspecto digitiforme das cristas mitocondriais (\*). B2: Presença de edema (E) e fragmentação de fibras musculares (cabeça de seta). Unesp, Jaboticabal, SP (2016).



**Figura 13.** Valores médios dos números de mitocôndrias normais e com lesão no ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo (VE) dos coelhos submetidos a protocolo de indução de cardiomiopatia por doxorubicina. Unesp, Jaboticabal, SP (2016).

GC: grupo controle; G1: grupo doxorubicina; G2: grupo doxorubicina + carvedilol; G3: grupo doxorubicina + ciclosporina; G4: grupo doxorubicina + sildenafil.

Φ Diferença significativa em relação ao GC pelo teste de qui-quadrado ( $p < 0,05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Toxicidade induzida pela doxorubicina em coelhos

Com o presente estudo demonstrou-se que o tratamento com doxorubicina na dose de 1mg/Kg, duas vezes por semana, durante seis semanas, foi capaz de induzir cardiomiopatia em coelhos, conforme descrito anteriormente (GAVA et al., 2013; GAVA, 2014). Além de dilatação cardíaca, disfunção diastólica e sistólica do ventrículo esquerdo e manifestação de sinais clínicos de insuficiência cardíaca congestiva, o presente estudo demonstrou a ocorrência de distúrbio de condução intraventricular, alteração do número de plaquetas circulantes, dos níveis séricos de ALT e creatinina, além de corroborar a ocorrência de alterações estruturais e ultraestruturais no miocárdio dos coelhos tratados com a antraciclina. Embora não estivesse entre os principais objetivos desse estudo, a descrição das alterações decorrentes do tratamento com doxorubicina em coelhos pode contribuir para a compreensão dos efeitos tóxicos exercidos por essa antraciclina.

Elevadas taxas de mortalidade foram observadas nos grupos tratados com doxorubicina, refletindo o potencial tóxico exercido por esse antineoplásico. Óbitos foram observados a partir de duas semanas de tratamento, sendo que a taxa de mortalidade ao término do tratamento foi de 40%, corroborando estudos anteriores que utilizaram o mesmo protocolo para indução de cardiomiopatia (GAVA et al., 2013; GAVA, 2014). Em estudo de cardiomiopatia induzida por doxorubicina em coelhos, HE et al. (2012) administraram o agente antineoplásico na mesma dose e intervalo, durante dois meses. No entanto, mesmo utilizando dose cumulativa mais elevada que a utilizada no estudo em tela e mantendo os animais vivos por dois meses após a última aplicação de doxorubicina, os autores não relataram a ocorrência de óbitos (HE et al., 2012).

Além de cardiomegalia generalizada, parte dos animais que receberam tratamento com doxorubicina apresentaram sinais de insuficiência cardíaca congestiva esquerda ou bilateral, caracterizados por edema pulmonar, hepatomegalia, derrame pericárdico, pleural e/ou ascite. Esses achados corroboram

estudos anteriores e refletem a elevada cardiotoxicidade do protocolo experimental utilizado (GAVA et al., 2013; GAVA, 2014).

Embora não estivesse entre os objetivos da presente investigação, os resultados obtidos refletiram a importância da ação mielossupressora exercida pela doxorubicina (SUSANECK, 1983; SILVA et al., 2004). Alterações como redução da contagem de hemácias, hematócrito e concentração de hemoglobina, não ocorreram de forma significativa nos animais tratados com doxorubicina. No entanto, seus valores médios se apresentaram abaixo dos valores de referência para a espécie leporina em determinados momentos de avaliação, refletindo o efeito tóxico desse agente antineoplásico (Tabela 1). Uma vez que alta mortalidade foi observada e que os animais que vieram a óbito foram excluídos das análises estatísticas, um baixo número de animais foi avaliado em cada grupo experimental (seis a sete). Acredita-se que algumas alterações não-significativas possam ganhar significância caso um maior número de animais venha a ser avaliado.

Apesar de não significativa à luz da análise estatística, observou-se tendência à discreta redução do número de hemácias circulantes, que inclusive apresentou-se abaixo dos valores de referência para a espécie leporina ao término do experimento, duas semanas após última aplicação de doxorubicina (Apêndices). Considerando-se os valores de normalidade para a espécie, alterações mais pronunciadas foram observadas no volume globular, que se apresentou abaixo dos valores de referência desde a primeira avaliação após início do tratamento com doxorubicina. O quadro anêmico detectado laboratorialmente se refletiu na coloração das mucosas, de modo que grande parte dos animais as apresentava pálidas ao longo do experimento. Destaca-se que duas semanas após a última aplicação de doxorubicina, o estado anêmico persistiu, denotando a elevada ação mielotóxica exercida por essa antraciclina. Esses resultados corroboram estudo anterior realizado a partir do mesmo modelo experimental, no qual o volume globular apresentou-se abaixo dos valores de referência após a primeira aplicação de doxorubicina, assim permanecendo até a última avaliação realizada (REIS et al., 2010). Estado anêmico grave e progressivo foi demonstrado por Klimtová et al. (2002) em modelo de cardiomiopatia por doxorubicina em coelhos, no qual utilizou-se dose cumulativa mais elevada, totalizando 11 semanas de acompanhamento. Em cães sob tratamento com

doxorubicina, Silva et al. (2004) também relataram redução da contagem de hemácias, hematócrito e taxa de hemoglobina quando comparados ao grupo controle, embora em nenhum momento os valores tenham se apresentado abaixo dos valores de referência para a espécie.

Outro aspecto importante da avaliação hematológica foi a variação da contagem do número de plaquetas circulantes. Após o início da terapia antraciclínica, observou-se redução na contagem plaquetária, que no M2 se apresentou abaixo dos valores de referência para a espécie e significativamente menor em comparação ao momento basal. À semelhança de resultados previamente descritos na espécie leporina, a contagem média de plaquetas retornou a valores próximos aos basais antes do término do protocolo experimental (KLIMTOVÁ et al., 2002; REIS et al., 2010). Uma vez que os animais não apresentaram sinais clínicos que sugerissem distúrbio de coagulação, como petéquias e tempo de sangramento aumentado após punção venosa, a relevância dos efeitos tóxicos exercidos pela doxorubicina sobre a contagem e função plaquetárias não foi estabelecida no presente estudo.

Curiosamente, os efeitos tóxicos da doxorubicina em coelhos exerceram pouca influência sobre a contagem de leucócitos totais, de modo que em momento algum os valores se apresentaram fora do intervalo de referência (Tabela 1). Esses achados se assemelham aos descritos previamente em modelo de cardiomiopatia induzida por doxorubicina em coelhos (REIS et al., 2010), porém diferem de estudos realizados em outras espécies, que destacaram grande sensibilidade dos leucócitos frente ao tratamento com esse agente antineoplásico (GERSHENSON, 1987; SILVA et al., 2004). Nossos resultados também diferem dos descritos por Klimtová et al. (2002), que se caracterizaram por redução da contagem de leucócitos após quatro aplicações semanais de doxorubicina em modelo experimental leporino. No entanto, ressalta-se que esses autores utilizaram doses mais elevadas do antineoplásico, equivalente a 3mg/Kg, o que pode justificar o maior efeito tóxico sobre os leucócitos.

Além de citotoxicidade sobre as células tumorais e cardíacas, a doxorubicina exerce efeito tóxico sobre outras células do organismo (VAN VLEET et al., 1978), como os hepatócitos e as células glomerulares epiteliais (PAPADOPOULOU et al., 1999; MANSOUR; EL-KASHEF; AL-SHABANAH, 1999; NAKAGE; SANTANA, 2008). No presente estudo, a mensuração sérica de biomarcadores de lesão ou função

hepática e renal teve como objetivo avaliar a segurança da associação dos fármacos testados com a doxorubicina, uma vez que eventual toxicidade adicional conferida pela associação poderia limitar sua aplicação clínica.

Ao longo do experimento, os níveis séricos de AST permaneceram inalterados nos animais do G1. Por outro lado, foi observado aumento dos níveis séricos de ALT, seguido de redução até atingir valores mínimos no M3, e finalmente retornarem a valores próximos aos basais no M4. Descreve-se atividade enzimática significativa de AST no fígado, coração, musculatura esquelética, rins e pâncreas, tornando sua avaliação pouco específica como indicador de função hepática na espécie leporina. No entanto, o aumento da atividade plasmática de ALT, observado no presente estudo, é considerado indicador específico de doença hepática em coelhos (CAMPBELL, 2015a). Diferentemente dos nossos resultados, Klimtová et al. (2002) não observaram alterações dos níveis séricos de biomarcadores de função hepática nem alterações histopatológicas do tecido hepático. Em cães submetidos a terapia com doxorubicina, também não foram observadas alterações na atividade enzimática de biomarcadores de função hepática, apesar da presença de lesões histopatológicas no tecido hepático (NAKAGE; SANTANA; 2008). Acredita-se que essas divergências possam ser decorrentes não apenas de variações da resposta individual frente ao tratamento com doxorubicina, mas também das diferentes doses e intervalos entre as aplicações.

Com relação aos biomarcadores de função renal, foi observado aumento da creatinina sérica nos animais do G1. Tal elevação ocorreu de maneira progressiva com doses cumulativas mais elevadas da antraciclina, retornando aos valores basais quinze dias após a última aplicação do fármaco. Quanto aos níveis séricos de uréia, o tratamento com doxorubicina não produziu alterações significativas. Aumento dos níveis séricos de uréia e creatinina e alterações histopatológicas em tecido renal foram descritos em modelo experimental leporino de cardiomiopatia induzida pela doxorubicina (KLIMTOVÁ et al., 2002). A partir do acompanhamento dos parâmetros bioquímicos de cães submetidos a tratamento com doxorubicina, Nakage e Santana (2008) não observaram alterações nos níveis séricos de uréia e creatinina, apesar da ocorrência de lesões histopatológicas renais. Ressalta-se que a mensuração sérica de uréia e creatinina apresenta baixa sensibilidade para o diagnóstico de doença

renal, uma vez que é necessária perda de 50 a 75% de capacidade funcional antes que a azotemia seja observada (CAMPBELL, 2015a). Considerando-se a maior sensibilidade da avaliação histopatológica para o diagnóstico de doença renal, sugere-se o uso dessa ferramenta quando da necessidade de avaliação detalhada dos efeitos nefrotóxicos do tratamento com doxorubicina em coelhos.

Ainda, ressalta-se que muitos dos animais em terapia com doxorubicina apresentavam desidratação severa. O processo de desidratação observado nesses animais pode ocorrer como consequência da anorexia e lesão renal gerados pelo tratamento com o agente antineoplásico. Sendo assim, acredita-se que os resultados obtidos nas provas hematológicas e bioquímicas subestimem as reais alterações presentes, devido à hemoconcentração resultante da redução do volume circulante.

A ausência de alterações clinicamente relevantes nos parâmetros eletrocardiográficos avaliados nos animais tratados com doxorubicina sugerem ausência de alterações estruturais e funcionais importantes no sistema de condução elétrico cardíaco, embora uma avaliação mais detalhada desse sistema não fosse parte dos objetivos propostos.

Ao avaliarem coelhos submetidos a protocolo de cardiomiopatia induzida por antraciclinas, Patáková et al. (2007) identificaram a ocorrência de aumento de duração de complexo QRS após a oitava aplicação semanal do fármaco. No entanto, Gava et al. (2011) não observaram alterações sugestivas de sobrecarga de câmaras cardíacas em coelhos submetidos ao mesmo protocolo de indução de cardiomiopatia que os animais do presente estudo. Ressalta-se que o exame eletrocardiográfico tem como principal indicação a avaliação do ritmo cardíaco, apresentando sensibilidade inadequada para inferir acerca da morfologia de câmaras cardíacas (TILEY, 1992; GOODWIN, 2002). Por essa razão, optou-se por avaliar a ocorrência de remodelamento cardíaco a partir do estudo ecocardiográfico, reservando à eletrocardiografia a avaliação do ritmo e da frequência cardíaca.

Considerando-se que a repolarização ventricular é um evento que requer gasto energético para o correto funcionamento da bomba de sódio-potássio, e que a principal fonte de energia para o trabalho cardíaco advém da respiração aeróbica, a perfusão dos cardiomiócitos e o suprimento energético adequados são fundamentais para a repolarização normal (TILLEY, 1992). Sendo assim, optou-se por avaliar essa

fase do ciclo cardíaco no eletrocardiograma, a partir da avaliação do segmento ST e onda T. No entanto, não foram identificadas diferenças significativas nesses parâmetros entre os grupos experimentais ou momentos de avaliação.

O intervalo QT compreende a despolarização e repolarização ventricular, representando a sístole elétrica ventricular (TILLEY, 1992). Além de variar de modo inversamente proporcional à frequência cardíaca, o intervalo QT pode estar alterado quando do tratamento com fármacos que influenciam no trabalho do sistema nervoso autônomo, ou mesmo como uma manifestação da toxicidade de alguns fármacos, (TILLEY, 1992). No presente estudo, a avaliação dessa variável eletrocardiográfica não indicou diferenças significativas em decorrência do tratamento com doxorrubicina ou de sua associação com os fármacos testados. No entanto, Patáková et al. (2007) destacaram a dificuldade de se identificar de forma precisa o término da repolarização ventricular no traçado eletrocardiográfico de coelhos como uma limitação da avaliação do intervalo QT nessa espécie. A mesma limitação foi descrita em ratos e camundongos, que podem apresentar o segmento ST extremamente curto ou mesmo inexistente (GAD, 1992; FARRAJ; HAZARI; CASCIO, 2011), de modo que deve-se ter cautela ao interpretar os resultados da avaliação do segmento ST, onda T e intervalo QT nessa espécie.

A ocorrência de arritmias cardíacas, distúrbio de condução intraventricular e supressão de milivoltagem da onda R foram descritas em cães tratados com doxorrubicina (MAULDIN et al., 1992; PEREIRA NETO et al., 2006; SOUZA; CAMACHO, 2006). Nas condições do presente estudo, a ocorrência de arritmias cardíacas foi um achado pouco frequente em coelhos tratados com doxorrubicina. Esses achados corroboram Gava et al. (2011), que não observaram a ocorrência de arritmias cardíacas em estudo com o mesmo modelo experimental leporino. É prudente destacar que a eletrocardiografia convencional permite avaliação pontual dos pacientes, apresentando baixa sensibilidade para identificar arritmias paroxísticas quando comparada à eletrocardiografia ambulatorial pelo sistema “Holter” (GOODWIN, 2002; MUCHA, 2007). Utilizando-se desta última modalidade de avaliação eletrocardiográfica, por período de 24 horas, demonstrou-se a ocorrência de arritmias ventriculares e supraventriculares em cães tratados com doxorrubicina (PEREIRA NETO et al., 2006).

Na presente investigação, a ocorrência de distúrbio de condução intraventricular mostrou-se mais frequente à medida que os coelhos recebiam doses cumulativas mais elevadas de doxorubicina (Tabela 4). Para esse parâmetro, não foram observadas diferenças entre os grupos ou entre os momentos de avaliação. No entanto, a partir da avaliação conjunta de todos os animais submetidos ao tratamento com doxorubicina, ao longo do tempo, foi possível estabelecer uma correlação entre a ocorrência de distúrbio de condução intraventricular e a toxicidade exercida pela doxorubicina, uma vez que a ocorrência desse distúrbio de condução se mostrou mais frequente nos dois últimos momentos de avaliação. Em estudo anterior que avaliou a cardiomiopatia induzida pela doxorubicina em coelhos, esse distúrbio de condução não foi observado (GAVA, 2011). Ressalta-se que, quando presente nos animais do presente estudo, o distúrbio de condução intraventricular não foi observado em todos os complexos QRS presentes nos traçados eletrocardiográficos, mostrando-se uma alteração paroxística. Sendo assim, a baixa frequência com que essa alteração foi observada também pode refletir a baixa sensibilidade da eletrocardiografia convencional para detectar alterações que não ocorram de forma sustentada.

As alterações ecodopplercardiográficas observadas nos coelhos tratados com doxorubicina refletiram principalmente a ocorrência de disfunção diastólica e sistólica do ventrículo esquerdo, que ocorreram de forma dose-dependentes, uma vez que progrediram à medida que doses cumulativas mais elevadas de doxorubicina foram utilizadas, corroborando estudos anteriores (GAVA et al., 2013; GAVA, 2014). Após a quarta aplicação de doxorubicina, equivalente a dose cumulativa de 8mg/Kg, os valores médios das frações de encurtamento e ejeção apresentaram declínio em todos os grupos experimentais tratados com doxorubicina, apresentando-se reduzidos no momento de avaliação subsequente (M3). Posteriormente, mesmo sem que os animais recebessem aplicações adicionais do fármaco após o M3, o declínio dos índices de função sistólica se estendeu de maneira progressiva até a última avaliação realizada, ilustrando, ao menos a curto prazo, o caráter irreversível da enfermidade. Como consequência, esses valores se apresentaram reduzidos nos dois últimos momentos de avaliação quando comparados aos momentos precedentes

(Figura 6), corroborando dados previamente descritos (GAVA et al., 2013; GAVA, 2014).

A carência de ferramentas ecodopplercardiográficas adequadas para a avaliação precisa da função diastólica do ventrículo esquerdo fez com que essa fase do ciclo cardíaco fosse negligenciada por anos, enquanto os estudos enfatizavam quase exclusivamente a avaliação da função sistólica. O advento da ecodopplercardiografia nas últimas décadas deu suporte ao surgimento de ferramentas ultrassonográficas que permitem uma avaliação acurada da função diastólica, trazendo consigo o reconhecimento do papel essencial da fase de enchimento ventricular para um adequado funcionamento da bomba cardíaca (BOON, 2011; DE MADRON, 2016). O enchimento diastólico requer gasto energético e sua disfunção precede a disfunção sistólica no processo de instalação da maioria das enfermidades cardíacas (DOUGHERTHY et al., 1984; GROSSMANN, 1990; ZILE; BRUTSAERT, 2002), incluindo a cardiomiopatia induzida pela doxorubicina (BORENSTEIN et al., 2006; NEILAN et al., 2006; GAVA, 2014).

No presente estudo, tanto a disfunção sistólica quanto a diastólica foram identificadas a partir do M3, quando os animais haviam recebido dose cumulativa de 12mg/Kg. Em um primeiro momento, o resultado de que ambas ocorreram a partir do mesmo momento de avaliação nos levaria a inferir que os dados discordam dos estudos anteriormente citados, que dizem que a disfunção diastólica precede a disfunção sistólica na cardiomiopatia induzida pela doxorubicina (BORENSTEIN et al., 2006; NEILAN et al., 2006; GAVA, 2014). No entanto, um intervalo de duas semanas separou o M2, quando não havia disfunção sistólica ou diastólica, do M3, equivalente a quatro aplicações adicionais de doxorubicina, aumentando a dose cumulativa de 8mg/Kg para 12mg/Kg. O fato de a disfunção diastólica e a sistólica terem sido observadas a partir do mesmo momento de avaliação não significa que ambas ocorreram ao mesmo tempo, uma vez que as duas podem ter se manifestado em qualquer momento entre as quatro aplicações adicionais de doxorubicina que ocorreram entre M2 e M3. Sendo assim, não se descarta a possibilidade de que a disfunção diastólica tenha de fato ocorrido anteriormente à sistólica, e de que possivelmente uma avaliação ecodopplercardiográfica adicional entre esses dois momentos de avaliação permitisse seu reconhecimento de maneira mais precoce.

O estudo da função diastólica foi realizado com base na avaliação conjunta de três parâmetros ecodopplercardiográficos: a relação entre os picos de velocidades das ondas E e A do fluxo de enchimento do ventrículo esquerdo, o tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) e a relação entre os picos de velocidades das ondas E' e A' da movimentação anular mitral septal e lateral, conforme o sistema de classificação da disfunção diastólica esquematizado nos Apêndices (BOON, 2011; DE MADRON, 2016).

Em decorrência dos elevados valores de frequência cardíaca observados na espécie leporina, frequentemente as ondas E e A do fluxo transmitral apresentam-se fusionadas (FONTES-SOUZA, 2009; ZACCHE et al., 2011; GAVA, 2014). Fontes-Souza et al. (2009) demonstraram que o uso de agentes anestésicos promoveu a separação dessas ondas em 67% dos coelhos hípidos avaliados. No entanto, o uso de contenção química deve ser evitado sempre que possível, não somente pela fragilidade da espécie frente a determinados agentes anestésicos, especialmente em se tratando de animais cardiopatas, mas também por poder alterar de maneira significativa os resultados de parâmetros ecodopplercardiográficos (STYPMANN et al., 2007; GAVA, 2014). Em estudo no qual avaliou coelhos submetidos ao mesmo protocolo experimental para indução de cardiomiopatia, sem o uso de contenção química, Gava (2014) descreve essa limitação, optando por se basear no TRIV e Doppler tecidual para avaliação da função diastólica ventricular esquerda.

Diante de tais informações, ressalta-se que algumas considerações acerca da avaliação da função diastólica realizada no presente estudo merecem ser feitas. Quando as ondas E e A de fluxo de enchimento mitral ou as ondas E' e A' de movimentação tecidual anular mitral apresentaram-se fusionadas, utilizou-se de manobra vagal por compressão do plano nasal para promover redução da frequência cardíaca, conforme previamente descrito para a espécie leporina (ZACCHE et al., 2011). O uso de estimulação vagal para promover a redução da frequência cardíaca e, conseqüentemente, a separação das ondas E e A do fluxo transmitral, foi previamente descrito na espécie felina (SMITH; SCHOBBER, 2013). No entanto, os autores não validaram a aplicação dessa manobra para a avaliação da função diastólica, e sua influência sobre os resultados obtidos permanece desconhecida. No entanto, em virtude da dificuldade de se avaliar a função diastólica quando da fusão

dessas ondas, optou-se pela aplicação dessa manobra no presente estudo, cujos resultados são discutidos a seguir.

A avaliação da proporção de animais que apresentaram fluxo transmitral com padrão anormal de relaxamento (razão  $E/A < 1$ ) no grupo doxorubicina (G1) apontou apenas leve aumento no M2, porém não-significativo à luz da análise estatística. Além disso, a totalidade dos animais apresentou padrão normal de relaxamento nas duas avaliações subsequentes. No entanto, a utilização exclusiva desse parâmetro para a avaliação da função diastólica é falha (BOON, 2011; DE MADRON, 2016), conforme se pode notar a partir de análise do sistema de classificação da disfunção diastólica (Apêndices). Apenas na presença de disfunção diastólica de estágio I observa-se a ocorrência de padrão anormal de relaxamento a partir da avaliação das ondas de fluxo transmitral, enquanto nos estágios mais graves de disfunção diastólica, a relação entre os picos de velocidades das ondas E e A volta a ser maior ou igual a um ( $E/A \geq 1$ ).

Considerando-se os dados obtidos a partir do padrão de relaxamento ventricular esquerdo por avaliação da movimentação tecidual anular mitral (Doppler tecidual), acredita-se que nos dois últimos momentos de avaliação, a maioria dos animais do G1 apresentassem disfunção diastólica de estágio II, com padrão pseudonormal (razão  $E/A \geq 1$ ) de relaxamento ventricular pela avaliação do fluxo transmitral. Isso porque a avaliação por Doppler tecidual revelou maior proporção de animais no G1 com padrão de relaxamento indicando disfunção diastólica nos dois últimos momentos de avaliação, M3 e M4. Esses resultados corroboram estudo anterior com o mesmo modelo leporino de cardiomiopatia, no qual Gava (2014) também demonstrou a ocorrência de disfunção diastólica após 12 aplicações de doxorubicina, utilizando-se da ferramenta do Doppler tecidual. No estudo em questão, o autor não tinha como objetivo a realização de avaliações ecodopplercardiográficas seriadas, e os animais foram avaliados por ecodopplercardiografia apenas após a 12ª aplicação (GAVA, 2014). Sendo assim, não é possível inferir se a disfunção diastólica teria começado anteriormente às 12 aplicações de doxorubicina, como ocorreu no presente estudo.

A avaliação do tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) é outra ferramenta ecodopplercardiográfica amplamente utilizada para avaliação da função diastólica (BOON, 2011; DE MADRON, 2016). No presente estudo, não foram observadas

alterações significativas durante o protocolo experimental nos animais do grupo G1. Esses resultados corroboram estudo anterior com o mesmo modelo leporino de indução de cardiomiopatia (GAVA, 2011). Em outro estudo realizado na espécie leporina, demonstrou-se redução do TRIV após dose cumulativa de 12mg/Kg de doxorrubicina, indicando a ocorrência de disfunção diastólica (GAVA, 2014). Na espécie canina, Sousa (2007) demonstrou a ocorrência de prolongamento do tempo de relaxamento isovolumétrico em indivíduos submetidos a tratamento com doxorrubicina.

O fato de o tempo de relaxamento isovolumétrico ter se mantido constante ao longo do estudo em tela não reflete necessariamente a ausência de disfunção diastólica. De acordo com o sistema de classificação apresentado nos Apêndices, as primeiras fases da disfunção diastólica caracterizam-se por aumento do TRIV, que é seguida de pseudonormalização dessa variável, momento em que os valores voltam a figurar entre os valores de normalidade, e por fim sofrem redução quando em estágios mais avançados da disfunção diastólica (DE MADRON, 2016). Considerando-se os resultados de TRIV à luz dos achados obtidos por Doppler tecidual anular mitral, que indicaram a presença de disfunção diastólica nos dois últimos momentos de avaliação, não se descarta a hipótese de que a ausência de alteração do TRIV em M3 e M4 sejam reflexo da pseudonormalização desse parâmetro, sugerindo a ocorrência de disfunção diastólica de estágio II, conforme ilustrado nos Apêndices. Sendo assim, o presente estudo corrobora estudos anteriores, que demonstraram a ocorrência de disfunção diastólica consequentemente ao tratamento com doxorrubicina em coelhos (GAVA; 2014), ratos, cães e seres humanos (MYRENG; SMISETH, 1990; NEILAN et al., 2006; TASSAN-MANGINA et al., 2006; SOUSA, 2007).

A partir da combinação dos tempos de contração e relaxamento isovolumétrico, bem como do tempo de ejeção do ventrículo esquerdo, o índice de performance miocárdica de Tei permite avaliação conjunta da função sistólica e diastólica (TEI, 1995; SOUSA, 2007), conforme ilustrado nos Apêndices. No presente estudo, doses cumulativas da antraciclina não ocasionaram alterações nesse parâmetro nos animais do G1, corroborando os achados descritos anteriormente por Gava (2014). No entanto, esses achados diferem dos observados por Sousa (2007), os quais

caracterizaram-se por aumento dos valores de ITEI durante terapia com doxorrubicina. Estudos conduzidos em seres humanos sob tratamento com doxorrubicina indicaram que o ITEI pode ser um indicador sensível de cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina (BELHAM et al., 2007; SENJU et al., 2007), embora os resultados obtidos em estudo conduzido por Rohde et al. (2006) sugerissem que esse índice não seja apropriado para detectar precocemente danos tóxicos decorrentes do emprego da antraciclina. Conforme destacado por Gava (2014), essa divergência demonstra que a avaliação desse índice ecodopplercardiográfico de forma isolada requer cautela, devido às variações nas respostas inter e intraespecíficas frente à terapia com doxorrubicina.

A avaliação histopatológica do miocárdio dos coelhos submetidos à terapia antraciclínica revelou a ocorrência de vacuolização e necrose de cardiomiócitos, além de fibrose intersticial. Essas alterações refletem a cardiotoxicidade em virtude do uso crônico de doxorrubicina, e foram descritas anteriormente (TAKEMURA; FUJIWARA, 2007; PONTES et al., 2010; LAI et al., 2011; KAWAGUCHI et al., 2012; GAVA et al., 2013).

As lesões histopatológicas foram mais pronunciadas no ventrículo direito que no esquerdo, diferindo dos resultados obtidos anteriormente em cães tratados com doxorrubicina, nos quais o ventrículo direito apresentou alterações mais discretas, quando comparadas às manifestadas no ventrículo esquerdo e septo interventricular (TOYODA; OKADA; KASHEM, 1998). Aliás, a maior parte dos estudos descreve as alterações histopatológica apenas do ventrículo esquerdo (SANTOS et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2004), enquanto os efeitos cardiotoxícos da doxorrubicina sobre a câmara ventricular direita são menos explorados.

Para melhor elucidar o envolvimento de diferentes regiões anatômicas do coração na cardiomiopatia induzida por doxorrubicina, Gava (2011) avaliou amostras do septo interventricular e das paredes livres dos ventrículos direito e esquerdo. No referido estudo, o autor observou semelhança entre as severidades das lesões observadas nas diferentes regiões anatômicas, porém os graus de fibrose intersticial se mostraram mais severos nos espécimes obtidos a partir do ventrículo direito. Conforme destacado por esse autor, esses fatos ressaltam a importância da avaliação

também do ventrículo direito, tendo em vista a susceptibilidade que essa câmara cardíaca apresenta frente aos efeitos tóxicos da doxorubicina (GAVA, 2011).

Em alguns dos espécimes avaliados, verificou-se também a presença de focos de infiltrado leucocitário no miocárdio, com predomínio de células mononucleares. Esse tipo de infiltrado inflamatório foi previamente descrito na cardiomiopatia induzida pela doxorubicina, e acredita-se que sua presença esteja relacionada à degradação do tecido lesionado (TAKEMURA; FUJIWARA, 2007; GAVA et al., 2013).

A avaliação do tecido cardíaco pela coloração de Tricrômio de Masson revelou a ocorrência de aumento do tecido fibroso intersticial nos animais tratados com doxorubicina. Esses achados corroboram estudo anterior realizado a partir do mesmo modelo leporino de cardiomiopatia, que demonstrou aumento da deposição de colágeno, principalmente no ventrículo direito (GAVA, 2011).

Embora os mecanismos exatos pelos quais a doxorubicina exerce seu papel cardiotóxico permaneçam controversos, evidências sugerem que o estresse oxidativo mitocondrial resulte em uma série de eventos, que por sua vez culminam na liberação de fatores pró-apoptóticos, iniciando a via das caspases (TAKEMURA; FUJIWARA, 2007; GAVA, 2014). No presente estudo, a expressão de caspase-3 no tecido cardíaco dos animais submetidos ao tratamento com doxorubicina foi demonstrada a partir da aplicação da técnica de imunistoquímica. A imunomarcação de células para caspase-3 foi observada nas paredes dos ventrículos direito e esquerdo, e indicou a presença de fibras com núcleos picnóticos e membrana citoplasmática íntegra, características da morte celular por apoptose (GAVA, 2014). Esses achados corroboram estudos anteriores, que demonstraram a expressão de caspase-3 como indicador de apoptose no miocárdio de animais com cardiomiopatia induzida pela doxorubicina (CHICCO et al., 2006; CHAO et al., 2011; GAVA, 2014).

O estudo por microscopia eletrônica de transmissão permitiu contemplar os aspectos ultraestruturais normais do miocárdio leporino, que se mostraram semelhantes ao que foi previamente descrito (WHEREAT; ORISHIMO; NELSON, 1969; SCHAPER; EISER; STAMMLER, 1985; GAVA, 2014). Apesar de apresentar custo relativamente elevado, sua utilização tem sido fundamental para a melhor compreensão da biologia mitocondrial e de sua resposta frente a grande variedade de enfermidades que acometem o sistema cardiovascular (FREY; MANNELLA, 2000;

ONG; HAUSENLOY, 2010). A partir dessa ferramenta, estudos têm demonstrado a ocorrência de alterações ultraestruturais importantes no miocárdio de animais com cardiomiopatia induzida pela doxorubicina (SCHWARZ et al., 1998; ZHOU et al., 2001; SANTOS et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2004; ASCENSÃO et al., 2006; LAI et al., 2011; KAWAGUCHI et al., 2012; GAVA, 2014).

No estudo em tela, os animais tratados com doxorubicina apresentaram miocitólise, com presença de bandas de hipercontração e aumento da matriz extracelular, semelhante ao que foi descrito por Gava (2014). Apesar dessa semelhança, este autor relatou que a alteração da morfologia mitocondrial foi o achado mais proeminente, sugerindo a participação do dano mitocondrial na patogênese da insuficiência cardíaca gerada pela doxorubicina, uma vez que a contagem de mitocôndrias com lesão apresentou correlação significativa com a redução dos índices de função sistólica.

O comprometimento funcional e estrutural mitocondrial na cardiomiopatia induzida pela doxorubicina tem sido amplamente descrito (SCHWARZ et al., 1998; ZHOU et al., 2001; KAWAGUCHI et al., 2011; GAVA, 2014.). Embora a patogenia exata da enfermidade permaneça controversa, evidências bioquímicas e fisiológicas sugerem que a administração de doxorubicina seja responsável pela formação de radicais livres nas mitocôndrias, que estimulam a peroxidação lipídica, alteram a integridade da membrana celular e causam alteração no transporte de cálcio mitocondrial, resultando na degeneração mitocondrial, formação de vacúolos, perda de miofilamentos e morte de cardiomiócitos (DOROSHOW, 1983; SINGAL et al., 1987; ZHOU et al., 2001; GREEN; LEEUWENBURGH, 2002; CHATTERJEE et al., 2010).

As mitocôndrias são as fontes primárias de energia na forma de ATP, que atua como combustível para os cardiomiócitos. As alterações da morfologia mitocondrial têm sido associadas a alterações na bioenergética mitocondrial, como a redução da fosforilação oxidativa (BENARD; ROSSIGNOL, 2008; ROSCA; HOPPEL, 2010). Com suprimento energético limitado, os cardiomiócitos ficam impossibilitados de exercer sua função de forma adequada, o que compromete a integridade das funções diastólica e sistólica e resulta na instalação da síndrome da insuficiência cardíaca congestiva.

Em nossa pesquisa, também foi observado aumento do número de mitocôndrias alteradas aglomeradas no sarcoplasma, que se apresentavam tumefeitas e com perda do aspecto digitiforme de suas cristas, resultando na formação de grandes vacúolos. No entanto, discordando de Gava (2014), essa alteração só esteve presente de maneira significativa no ventrículo direito dos coelhos submetidos ao tratamento com doxorrubicina. A avaliação cuidadosa das imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão de espécimes do ventrículo esquerdo dos animais que receberam doxorrubicina não revelou aumento da porcentagem de mitocôndrias com lesão.

Prudente destacar que no presente estudo, os animais foram submetidos a eutanásia duas semanas após a última aplicação de doxorrubicina, enquanto Gava (2014) submeteu os animais ao mesmo protocolo, sacrificando-os logo após a última dose do antineoplásico. Dessa forma, acredita-se que tal diferença seja consequência dos diferentes protocolos experimentais. Acredita-se que as duas semanas nas quais os coelhos ficaram sem tratamento com doxorrubicina podem ter sido suficientes para que mitocôndrias alteradas fossem removidas da célula por mecanismos como a autofagia, que possui entre muitas ações a função de remover organelas defeituosas e, dependendo do grau de injúria celular, proteger ou induzir a apoptose desta célula. Ainda, hipotetiza-se que esse mecanismo poderia explicar as diferenças observadas entre os ventrículos direito e esquerdo, pois neste último houve menor proporção de organelas alteradas quando comparado ao ventrículo direito.

Outro aspecto a ser destacado é o fato de que a indução da apoptose, observada nos grupos tratados com doxorrubicina, pode ter ocorrido não somente pela via intrínseca, devido ao dano mitocondrial ocasionado pelo estresse oxidativo, mas também como resultado da ocorrência de processo de autofagia. Essa possibilidade poderia justificar a ocorrência de apoptose, que foi observada a partir da técnica de imunistoquímica, mesmo na ausência de grande número de mitocôndrias com lesão presentes nos cardiomiócitos.

Em estudo anterior com modelo murino de cardiomiopatia induzida por doxorrubicina, demonstrou-se que mesmo após três ou cinco semanas após a última aplicação do antineoplásico, as lesões ultraestruturais estavam presentes em gravidade semelhante ou pior, dando suporte ao caráter irreversível da cardiomiopatia

induzida pela doxorubicina (ZHOU et al., 2001). No entanto, os autores observaram redução do número total de mitocôndrias, e não se basearam exclusivamente na morfologia mitocondrial para obter os resultados descritos (ZHOU et al., 2001). Por fim, sugere-se que a avaliação do tecido cardíaco à luz da microscopia eletrônica de transmissão, com base exclusivamente na contagem do número de mitocôndrias com lesão, não seja a melhor opção.

Apesar dos grandes avanços proporcionados pela microscopia eletrônica de transmissão, vários aspectos acerca da biologia mitocondrial, sua resposta e alteração morfológica frente a diversas enfermidades cardíacas ainda são motivo de controvérsia (FREY; MANNELLA, 2000; ROSCA; HOPPEL, 2010). Estudos anteriores descreveram os mais variados comportamentos dessas organelas frente à instalação de doenças cardíacas e insuficiência cardíaca congestiva, como alterações no número, tamanho e forma, presença de alterações degenerativas como edema, perda do aspecto digitiforme e formação de grandes vacúolos, formação de autofagossomos, presença de mitocôndrias intranucleares e a presença de megamitocôndrias (BAKEEVA et al., 2001; WREDENBERG et al., 2002; ONG; HAUSENLOY, 2010; ROSCA; HOPPEL, 2010; KAWAGUCHI et al., 2012; GAVA, 2014). Essas diferenças refletem a complexidade da biologia mitocondrial e de sua resposta frente aos diversos agentes agressores.

Não bastassem essas dificuldades, uma importante limitação da microscopia eletrônica reside no fato de que fornece imagens estáticas, obtidas de forma pontual, não possibilitando a visualização direta da dinâmica e morfologia mitocondrial (ONG; HAUSENLOY, 2010). Para minimizar essa limitação, ressalta-se a importância da realização de avaliações seriadas para melhor compreensão das respostas mitocondriais frente aos efeitos cardiotoxícos exercidos pela doxorubicina. Contemplar e compreender melhor a morfologia mitocondrial em diferentes fases do protocolo de indução de cardiomiopatia por doxorubicina, poderia permitir uma avaliação mais precisa e minuciosa acerca de possíveis efeitos benéficos decorrentes do tratamento concomitante com fármacos com potencial para conferir proteção miocárdica.

De posse dessas informações e considerando-se que a lesão mitocondrial não foi o aspecto mais marcante no miocárdio de coelhos submetidos a tratamento com

doxorubicina, sugere-se o uso de formas alternativas para a avaliação ultraestrutural da lesão miocárdica observada. Em estudos anteriores, a utilização de sistemas baseados em escores para avaliação ultraestrutural do coração de animais com cardiomiopatia induzida pela doxorubicina foi descrita (ZHOU et al., 2001; SANTOS et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2004; ASCENSÃO et al., 2006), e acredita-se que essa seja uma alternativa pertinente para avaliação futura das imagens obtidas no estudo em tela.

## **6.2. Cardioproteção farmacológica na cardiomiopatia induzida pela doxorubicina em coelhos**

A descoberta das antraciclinas na década de 1960 representou um grande progresso na batalha contra diversas neoplasias malignas que acometem os animais e seres humanos. Embora apresente excelente eficácia antineoplásica, seu uso pode ser limitado pela ocorrência de efeitos cardiotoxicos cumulativos e dose-dependentes. Inúmeros estudos foram realizados na tentativa de elucidar os mecanismos responsáveis pela cardiotoxicidade decorrente da terapia antraciclínica, para que se possam estabelecer medidas eficazes para sua prevenção (ZHOU et al., 2001; SIMUNEK et al., 2004). Apesar de muitas tentativas, o tratamento com doxorubicina ainda é limitado por seus efeitos cardiotoxicos, uma vez que as alternativas disponíveis para reduzir sua citotoxicidade aos cardiomiócitos ainda são pouco eficientes. Estudos *in vitro* ou com modelos experimentais demonstraram o potencial cardioprotetor conferido por diversos fármacos. Sendo assim, ressalta-se a importância de estudos adicionais antes que esses fármacos possam ser prescritos para pacientes oncológicos.

O estudo em tela teve como principal objetivo testar os efeitos de três fármacos sobre a cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina em um modelo experimental leporino previamente estabelecido (GAVA et al., 2013). Os fármacos testados foram escolhidos com base em resultados descritos anteriormente, que relataram que esses fármacos conferiram proteção miocárdica em diferentes modelos experimentais

(MATSUI et al., 1999; SANTOS et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2004; FISHER et al., 2005; DAS et al., 2010; MARECHAL et al., 2011; HE et al., 2012).

Os tratamentos testados no presente estudo não foram eficazes para reduzir a mortalidade ou evitar a ocorrência de alterações clínicas e macroscópicas decorrentes dos efeitos tóxicos da antraciclina sobre o coração. Ressalta-se que muitos dos estudos que relataram efeito cardioprotetor conferido por esses fármacos não mencionaram a condição clínica dos animais (FISHER et al., 2005; DAS et al., 2010; MARECHAL et al., 2011; HE et al., 2013). Acredita-se que tal informação seja de extrema relevância, uma vez que a qualidade de vida dos pacientes em tratamento com agentes antineoplásico deve ser prioridade. Em estudo com modelo experimental murino no qual não se observaram óbitos, Santos et al. (2002) também relataram que o tratamento com carvedilol não foi eficaz em prevenir a perda de peso, ascite e hepatomegalia nos animais tratados com doxorubicina, apesar de descreverem proteção miocárdica a partir dos resultados dos exames de microscopia eletrônica e de luz. Por outro lado, Matsui et al. (1999) observaram que o tratamento com carvedilol reduziu a mortalidade e evitou a ocorrência de disfunção sistólica do ventrículo esquerdo, ascite e hepatomegalia em outro modelo murino.

Estudos anteriores que avaliaram os efeitos da associação da doxorubicina com os fármacos testados no presente estudo, não descreveram a realização de avaliação hematológica ou bioquímica sérica (MATSUI et al., 1999; SANTOS et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2004; FISHER et al., 2005; DAS et al., 2010; MARECHAL et al., 2011; HE et al., 2013). Alterações como redução da contagem de hemácias, hematócrito e concentração de hemoglobina, não ocorreram de forma significativa em todos os grupos experimentais. Animais do G4 apresentaram redução significativa da contagem de hemácias e volume globular, enquanto no G3 apenas o segundo apresentou redução significativa (Tabela 1). No entanto, animais de todos os grupos experimentais apresentaram valores médios desses parâmetros abaixo dos valores de referência para a espécie em determinados momentos, durante tratamento com doxorubicina. Conforme destacado anteriormente, acredita-se que o baixo número de animais remanescentes ao término do estudo e conseqüentemente utilizados para a realização da análise estatística possa ter influenciado nos resultados obtidos.

Os níveis séricos de ALT sofreram alteração ao longo do protocolo experimental. Quanto às concentrações séricas de AST, não foram observadas alterações significativas durante protocolo de indução de cardiomiopatia por doxorubicina, exceto nos animais do G4. No entanto a Tabela 2 mostra que nos momentos M1 e M2 os valores de ALT nesse grupo experimental apresentaram-se mais elevados quando comparados aos animais do G1 (embora essa diferença não tenha se refletido estatisticamente). Curiosamente, foi justamente nesses mesmos momentos de avaliação em que se observaram os valores mais elevados de AST. Sendo assim, não se descarta a hipótese de que o tratamento com sildenafil tenha potencializado o dano hepático nos animais em tratamento com doxorubicina. No entanto, a confirmação dessa hipótese requer a utilização de ferramentas adicionais para avaliação do tecido hepático, como a realização de avaliação histopatológica, para avaliar e comparar a gravidade das alterações observadas.

No presente estudo, observaram-se variações significativas dos níveis séricos de creatinina em todos os grupos experimentais à exceção do G2 (Tabela 2), no qual elevações significativas não foram observadas durante tratamento com doxorubicina. Ao fornecer carvedilol a ratos hipertensos em tratamento com doxorubicina, Jovanovic et al. (2009) demonstraram uma melhora significativa na função renal e redução da progressão da insuficiência renal. Em conjunto, esses dados sugerem redução da toxicidade renal pela doxorubicina quando associada ao tratamento com carvedilol, embora o uso de ferramentas adicionais se faça necessário.

A ausência de alterações eletrocardiográficas clinicamente relevantes nos animais da presente investigação sugerem que a eletrocardiografia convencional não seja uma ferramenta útil para avaliação de cardioproteção na cardiomiopatia induzida pela doxorubicina em modelo leporino. Por outro lado, não se descarta o emprego da eletrocardiografia ambulatorial pelo sistema "Holter" com essa finalidade, considerando-se sua maior sensibilidade para detecção de arritmias e distúrbios de condução paroxísticos (GOODWIN, 2002; PEREIRA NETO et al., 2006; MUCHA, 2007).

Não foram observadas alterações quanto à frequência cardíaca entre os grupos experimentais ou os momentos de avaliação. No entanto, os animais do G2 foram os que apresentaram os valores mais baixos dessa variável, em todos os momentos de

avaliação nos quais os animais estavam sob tratamento com carvedilol (Tabela 3). Acredita-se que a diferença seja decorrente da atividade inibitória sobre receptores  $\beta$ -adrenérgicos exercida por esse fármaco, que resultam no aumento da atividade parassimpática (MARCONDES-SANTOS et al., 2007; OYAMA et al., 2007).

O estado de ação autonômica pode ser avaliado mediante estudo da variabilidade da frequência cardíaca, uma ferramenta do exame eletrocardiográfico ambulatorial que tem sido amplamente estudada em diferentes enfermidades cardiovasculares (DREIFUS et al., 1993; HUIKURI; STEIN, 2013; PEREIRA, 2015). A variabilidade da frequência cardíaca diminui diante da ativação do sistema nervoso simpático, que ocorre durante o processo de instalação da insuficiência cardíaca congestiva. O estudo da variabilidade da frequência cardíaca tem sido utilizado em modelos experimentais de cardiomiopatia induzida pela doxorubicina, mostrando-se uma ferramenta útil para o diagnóstico precoce do dano cardíaco (MOGUILEVSKI; OLIVER; MCGRATH, 1995; LONCAR-TURUKALO et al., 2015). A avaliação da variabilidade da frequência cardíaca consiste em ferramenta adicional para avaliação da proteção miocárdica no modelo experimental em discussão, e sugere-se sua aplicação a fim de explorar de maneira mais intensa os efeitos do carvedilol sobre o grau de atividade autonômica em coelhos tratados com doxorubicina.

Na pesquisa em tela, a ocorrência de distúrbio de condução intraventricular mostrou-se mais frequente à medida que os coelhos recebiam doses cumulativas mais elevadas de doxorubicina (Tabela 4). Uma vez que tal diferença não se mostrou significativa à luz da análise estatística, não foi possível estabelecer uma correlação entre a ocorrência desse distúrbio e a toxicidade exercida pela doxorubicina. No entanto, não se descarta a hipótese de que a partir da avaliação de maior número de animais, a ocorrência desse distúrbio de condução pudesse apresentar significância estatística, e assim ser utilizado como parâmetro para avaliar proteção miocárdica frente ao tratamento com a antraciclina.

A ecodopplercardiografia permite a avaliação não-invasiva da função cardíaca e tem sido extensivamente utilizada em modelos experimentais de cardiomiopatia induzida pela doxorubicina. A fração de encurtamento do ventrículo esquerdo, um dos mais tradicionais índices de função sistólica, representa o encurtamento do diâmetro interno do ventrículo esquerdo durante a sístole ventricular (BOON, 2011).

Em nosso estudo, os animais submetidos a tratamento com doxorubicina apresentaram redução significativa das frações de encurtamento e ejeção a partir do M3, mesmo naqueles submetidos a tratamento concomitante com carvedilol, ciclosporina-A ou sildenafil (Figura 6). Esse resultado indica que o tratamento com os fármacos testados, nas condições do presente estudo, não foram eficazes em retardar ou prevenir a ocorrência de disfunção sistólica do ventrículo esquerdo.

Diferentemente do que se observou no presente estudo, He et al. (2012) observaram que a redução da fração de encurtamento decorrente do tratamento com doxorubicina foi atenuada, mas não revertida, nos coelhos tratados com carvedilol. Nesse estudo, os autores empregaram a mesma dose e os mesmos intervalos entre as aplicações de doxorubicina, porém os animais foram tratados durante oito semanas, o que correspondeu a dose cumulativa de 16mg/Kg. Curiosamente, esse estudo avaliou os efeitos do carvedilol sobre a reversão da cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina, uma vez que o tratamento foi instituído apenas duas semanas após a última aplicação da antraciclina, com disfunção sistólica já instalada (HE et al., 2012). Esses resultados são interessantes, uma vez que a literatura descreve o caráter refratário da cardiomiopatia induzida pela doxorubicina (SOUZA; CAMACHO, 2006; TAKEMURA; FUJIWARA, 2007; LONCAR-TURUKALO et al., 2015).

Por outro lado, os resultados apresentados corroboram Kim et al. (2012), que revelaram que a disfunção sistólica causada pela doxorubicina em ratos não foi prevenida pelo tratamento concomitante com carvedilol. No entanto, alguns estudos realizados com diferentes modelos de cardiomiopatia induzida por doxorubicina em ratos e camundongos indicaram atenuação da disfunção sistólica quando do tratamento concomitante com carvedilol (MATSUI et al., 1999), ciclosporina-A (MARECHAL et al., 2011) e sildenafil (FISHER et al., 2005). Essa diferença pode refletir a grande variabilidade de respostas observadas entre indivíduos de diferentes espécies ou raças, ou mesmo a grande divergência quanto à dose e posologia da doxorubicina ou dos fármacos com potencial efeito cardioprotetor.

Os dados obtidos a partir do estudo ecodopplercardiográfico caracterizaram a ocorrência de disfunção diastólica a partir do M3. Esse dado teve como base a avaliação da proporção de animais que apresentaram padrão normal ou anormal de relaxamento miocárdico a partir do Doppler tecidual, e demonstrou diferença

significativa nos dois últimos momentos de avaliação (Tabela 6). No entanto, essa diferença não foi observada nos animais do G2, o que significa que a proporção de animais com disfunção diastólica não aumentou durante o protocolo de indução de cardiomiopatia, e esse destaca-se entre os resultados mais expressivos do presente estudo. Esses achados diferem de Kim et al. (2012), os quais relataram, a partir do estudo por ferramentas invasivas, que o uso do carvedilol não foi eficaz para prevenir a disfunção diastólica causada pelo tratamento com doxorubicina. Conforme citado anteriormente, ressalta-se que a maioria dos estudos realizados em modelos experimentais de cardiomiopatia induzida pela doxorubicina não descreve a avaliação da função diastólica, e dados acerca dos efeitos que esses fármacos exerceram sobre a disfunção diastólica são escassos.

A partir da avaliação histopatológica de fragmentos de miocárdio corados com hematoxilina e eosina, graus variáveis de necrose foram observados (Figura 8). Entre os grupos tratados com doxorubicina, os animais do G1 e G3 foram os que apresentaram maior severidade dessa lesão, enquanto nos animais tratados com carvedilol ou sildenafil (G2 e G4, respectivamente) os graus de necrose de cardiomiócitos não diferiram dos observados nos animais do grupo controle. É prudente destacar que dois dos sete animais avaliados no G2 não apresentaram necrose de cardiomiócitos (Figura 8). Considera-se este um resultado interessante, tendo em vista que em nenhum animal dos demais grupos tratados com doxorubicina foi observada ausência desta lesão histopatológica nos espécimes de ventrículo esquerdo.

Ainda com relação aos espécimes obtidos a partir de amostras de ventrículo esquerdo, os graus de vacuolização citoplasmática observados nos indivíduos do G3 foram os únicos que diferiram dos observados nos do grupo controle. Os parâmetros avaliados no presente estudo não nos permitem determinar a relevância desse achado, bem como sua causa. Estudos anteriores descrevem efeitos controversos da ciclosporina-A quando em associação à terapia antraciclínica. Enquanto Marechal et al. (2011) relataram efeitos benéficos como redução da disfunção sistólica, da taxa de mortalidade e das lesões ultraestruturais em camundongos, outro estudo observou aumento da distribuição da doxorubicina para o miocárdio, rins e fígado de ratos e camundongos, quando de sua associação com a ciclosporina-A, sugerindo cautela

quando do uso dessa associação, em decorrência de possível potencialização de seus efeitos citotóxicos (COLOMBO; ZUCCHETTI; D'INCALCI, 1994). No entanto, ressalta-se que as doses utilizadas nesse último estudo foram bastante elevadas: 12,5 ou 25mg, comparadas com a dose de 1mg/Kg utilizada por Marechal et al. (2011). Outra vez, destaca-se a possibilidade de que a falta de significância entre as diferenças de severidade das lesões observadas nos diferentes grupos experimentais, possa ser consequência do reduzido número de indivíduos remanescentes ao término do protocolo experimental.

Hipotetiza-se que a presença de cardiomiócitos com citoplasma acentuadamente vacuolizado (Figura 8) representem aqueles cardiomiócitos que, à microscopia eletrônica, mostravam inúmeras mitocôndrias dilatadas e que se fundiam, formando múltiplos vacúolos no sarcoplasma. Destaca-se que o único aspecto que permitia identificar estas células como oriundas do músculo cardíaco eram resquícios de miofibrilas próximas à membrana citoplasmática (dados não mostrados). Acredita-se que capacidade contrátil de cardiomiócitos com tamanha severidade de lesão esteja extremamente comprometida, e possivelmente esta célula deva sofrer processo de apoptose.

Após morte de cardiomiócitos, o tecido é substituído por tecido fibroso, caracterizado por deposição de fibras colágenas. Na nossa pesquisa, o aumento de tecido conjuntivo intersticial foi demonstrado nos animais tratados com doxorrubicina quando comparados ao grupo controle (Tabela 7). No entanto, o tratamento com carvedilol reduziu a ocorrência de fibrose miocárdica, de modo que a quantidade de tecido fibroso presente no miocárdio dos animais do G2 não diferiu da quantidade presente nos coelhos do grupo controle. A avaliação da redução de fibrose miocárdica como um indicador de proteção miocárdica não foi relatada em estudos anteriores nos quais se investigaram os efeitos do carvedilol sobre a cardiotoxicidade decorrente do tratamento com doxorrubicina (MATSUI et al., 1999; SANTOS et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2004).

A imunodeteção de caspase-3 revelou a ocorrência de morte celular por apoptose no tecido cardíaco. Tanto no ventrículo direito como no esquerdo, houve diferença significativa na contagem de células apoptóticas nos animais que receberam doxorrubicina (G1, G2, G3 e G4) em comparação com os animais do grupo controle.

Entretanto, apenas os animais que receberam tratamento concomitante com carvedilol (G2), apresentaram menor número de células imunomarcadas em comparação aos animais do grupo G1, tratados exclusivamente com a antraciclina (Figura 11). Esses achados diferem dos resultados obtidos em estudo com modelo leporino de cardiomiopatia induzida pela doxorrubicina, no qual Fisher et al. (2005) demonstraram que o tratamento concomitante com sildenafil reduziu a ocorrência de apoptose no tecido cardíaco. Estudos que demonstraram cardioproteção miocárdica a partir do uso de carvedilol em ratos sob tratamento com doxorrubicina, não determinaram a ocorrência de apoptose como um parâmetro para avaliar cardioproteção (MATSUI et al., 1999; SANTOS et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2004; HE et al., 2012).

A microscopia eletrônica de transmissão consiste em ferramenta de avaliação ultraestrutural dos tecidos, e teve papel importante na contribuição para a melhor compreensão dos mecanismos celulares responsáveis pelos efeitos cardiotoxícos provocados pela doxorrubicina. Em seu estudo com modelo leporino, Gava (2014) destacou que a alteração da morfologia mitocondrial foi o achado mais proeminente do estudo por microscopia eletrônica. Conforme destacado anteriormente, a proporção de mitocôndrias com lesão em relação às normais apresentou-se significativamente maior no ventrículo direito dos animais tratados com doxorrubicina quando comparados aos do grupo controle, e não foram atenuadas pelo tratamento com carvedilol, ciclosporina-A ou sildenafil. Esses achados diferem de estudo anterior realizado em modelo experimental com ratos, onde observou-se que o tratamento com carvedilol reduziu a ocorrência de mitocôndrias com lesão nos cardiomiócitos (OLIVEIRA et al., 2004). Ressalta-se que não foram observadas diferenças entre a proporção de mitocôndrias com lesão com relação às normais nos fragmentos de ventrículo esquerdo de animais tratados com doxorrubicina quando comparados ao grupo controle. Com base nos resultados obtidos nas condições do presente estudo, acredita-se que a avaliação de cardioproteção a partir da avaliação ultraestrutural do miocárdio não deva ser realizada com base exclusivamente na contagem da proporção de mitocôndrias com ou sem lesão.

Apesar da ausência de diferença com relação à lesão mitocondrial observada nos diferentes grupos experimentais, alterações como fragmentação de fibras

cardíacas, presença de bandas de hipercontração e aumento da matriz extracelular estiveram presentes nos fragmentos de ventrículo esquerdo dos animais tratados com doxorubicina, confirmando a ocorrência de lesão tecidual. Embora essas lesões não tenham se apresentado menos graves nos grupos tratados com carvedilol, ciclosporina-A ou sildenafil, esses achados foram observados exclusivamente à luz da análise subjetiva, sendo que parâmetros objetivos não foram utilizados para a avaliação ultraestrutural do miocárdio. Ao avaliar um modelo murino de cardiomiopatia induzida por doxorubicina, Oliveira et al. (2004) demonstraram a ocorrência de lesões miocárdicas ultraestruturais caracterizadas por vacuolização citoplasmática, edema celular e lesão mitocondrial. No mesmo estudo, demonstrou-se que o tratamento concomitante com carvedilol resultou na redução da severidade de lesões como vacuolização e edema, demonstrando ação cardioprotetora conferida por esse fármaco (OLIVEIRA et al., 2004). Apesar da melhora observada à luz da microscopia eletrônica de transmissão, os autores não descreveram a ocorrência de redução da severidade das lesões mitocondriais. Em outro estudo realizado com modelo experimental de cardiomiopatia induzida pela doxorubicina, Marechal et al. (2011) demonstraram proteção miocárdica a partir do número e morfologia mitocondriais, e não a partir de lesões estruturais nessas organelas. Conforme discutido anteriormente, esses achados refletem a necessidade de outro método de avaliação das alterações ultraestruturais do miocárdio no presente estudo, além da contagem da proporção de mitocôndrias com lesão.

Por fim, uma importante consideração referente ao modelo experimental estudado reside no fato que o mesmo é altamente agressivo para os animais estudados. Na prática da oncologia, o tratamento com doxorubicina é realizado respeitando-se alguns princípios, entre eles o intervalo entre as aplicações. No presente estudo, os intervalos entre as aplicações do antineoplásico era extremamente curto, variando entre três e quatro dias. Embora esse modelo tenha na sua curta duração uma enorme vantagem, o reduzido intervalo entre as aplicações faz com que os animais tenham pouco tempo para se recuperar após cada aplicação da antraciclina. Sendo assim, não se descarta a hipótese de que os efeitos protetores pudessem ser mais expressivos num protocolo mais longo, com maior intervalo entre as aplicações de doxorubicina.

Com base nos achados apresentados, considera-se que o presente estudo contribuiu para os conhecimentos acerca dos efeitos cardiotoxicos decorrentes do tratamento com doxorrubicina, além de sugerir que novos estudos sejam realizados com a finalidade de avaliar a eficácia do uso do carvedilol para sua prevenção.

## 7. CONCLUSÕES

Fundamentando-se nos resultados obtidos nas condições do presente estudo, pode-se concluir que:

- A ocorrência de distúrbio de condução intraventricular apresentou-se cada vez mais frequente ao longo do protocolo experimental, sugerindo que esse parâmetro possa ser utilizado como ferramenta adicional para avaliar a cardiotoxicidade da doxorubicina em coelhos;
- O carvedilol, a ciclosporina-A e o citrato de sildenafil não foram capazes de evitar a ocorrência de disfunção sistólica, cardiomegalia e insuficiência cardíaca congestiva, nem de reduzir a mortalidade de coelhos submetidos a protocolo de indução de cardiomiopatia com doxorubicina;
- Apenas o tratamento com carvedilol reduziu a ocorrência de disfunção diastólica, a apoptose e necrose de cardiomiócitos e a fibrose miocárdica nos coelhos submetidos a protocolo de indução de cardiomiopatia com doxorubicina;
- As interações farmacológicas do carvedilol, ciclosporina-A e citrato de sildenafil com a doxorubicina não exerceram efeitos negativos importantes sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos avaliados;
- As alterações na morfologia mitocondrial não foram achados ultraestruturais definitivos na caracterização da cardiomiopatia induzida pela doxorubicina.

## 8. REFERÊNCIAS

AL-HARTHI, S.E.; ALARABI, O.M.; RAMADAN, W.S.; ALAAMA, M.N.; AL-KREATHY, H.M.; DAMANHOURI, Z.A.; KHAN, L.M.; OSMAN, A.M. Amelioration of doxorubicin-induced cardiotoxicity by resveratrol. **Molecular Medicine Reports**, v.10, n.3, p.1455-1460, 2014.

ANDRADE, J.N.B.M.; CAMACHO, A.A.; CUEVAS, S.E.; SILVA, C.E.V.; SANTOS, P.S.P.; FANTINATTI, A.; NUNES, N.; STOPIGLIA, A.J. Plicatura da parede livre do ventrículo esquerdo em cão com cardiomiopatia dilatada induzida pela doxorubicina. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v.19, n.1, p.40-43, 2003.

ASCENSÃO, A.; MAGALHÃES, J.; SOARES, J.; FERREIRA, R.; NEUPARTH, M.; MARQUES, F.; DUARTE, J. Endurance exercise training attenuates morphological signs of cardiac muscle damage induced by doxorubicin in male mice. **Basic and Applied Myology**, v.16, n.1, p.27-35, 2006.

AZZOLIN, K.O.; CASTRO, I.; FEIER, F.; PANDOLFO, F.; ODERICH, C. Valor prognóstico do Índice de Performance miocárdica no Pós-operatório de Cirurgia de revascularização miocárdica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.87, n.4, p.456-461, 2006.

BAINES, C.P. The molecular composition of the mitochondrial permeability transition pore. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.46, n.6, p.850-857, 2009.

BAKEEVA, L.E.; SKULACHEV, V.P.; SUDARIKOVA, Y.V.; TSYPLENKOVA, V.G. **Mitochondria enter the nucleus (one further problem in chronic alcoholism)**. *Biochemistry*, v.66, n.12, p.1335-1341, 2001.

BELHAM, M.; KRUGER, A.; MEPHAM, S.; FAGANELLO, G.; PRITCHARD, C. Monitoring left ventricular function in adults receiving anthracycline-containing chemotherapy. **European journal of heart failure**, v.9, n.4, p.409-414, 2007.

BENARD, G.; ROSSIGNOL, R. Ultrastructure of the mitochondrion and its bearing on function and bioenergetics. **Antioxidant & Redox Signaling**, v.10, n.8, p.1313-1342, 2008.

BOON, J.A. **Veterinary echocardiography**. 2.ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2011. 610p.

BORENSTEIN, N.; BRUNEVAL, P.; BEHR, L.; LABORDE, F.; MONTARRAS, D.; DAURÈS, J.P.; DERUMEAUX, G.; POUCHELON, J.L.; CHETBOUL, V. An ovine model of chronic heart failure: echocardiographic and tissue Doppler imaging characterization. **Journal of Cardiac Surgery**, New York, v.21, n.1, p.50-56, 2006.

BROWN, A.J.; DAVISON, E.; SLEEPER, M.M. Clinical efficacy of sildenafil in treatment of pulmonary arterial hypertension in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.24, p.850-854, 2010.

CAMACHO, A.A.; ANDRADE, J.N.B.M. Plication of the free wall of the left ventricle in dogs with doxorubicin-induced cardiomyopathy. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.66, n.2, p.238-243, 2005.

CAMPBELL, T.W. Bioquímica clínica de mamíferos: animais de laboratório e espécies variadas. In: THRALL, M. A.; WEISER, G., ALLISON, R.W., CAMPBELL, T.W. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015a. p.498-507.

CAMPBELL, T.W. Hematologia dos mamíferos: animais de laboratório e espécies variadas. In: THRALL, M. A.; WEISER, G., ALLISON, R.W., CAMPBELL, T.W. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015b. p.194-204.

CASSALI, G.D. LAVALLE, G.E.; DE NARDI, A.B.; *et al.* Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, São Paulo, v.4, n.2, p.153-180, 2011.

CHAO, H.H.; LIU, J.C.; HONG, H.J.; LIN, J.W.; CHEN, C.H.; CHENG, T.H. L-carnitine reduces doxorubicin-induced apoptosis through a prostacyclin-mediated pathway in neonatal rat cardiomyocytes. **International Journal of cardiology**, Amsterdam, v.146, n.2, p.145-152, 2011.

CHATTERJEE, K.; ZHANG, J.; HONBO, N.; KARLINER, J.S. Doxorubicin cardiomyopathy. **Cardiology**, v.115, n.2, p.155-162, 2010.

CHICCO, A.J.; HYDOCK, D.S.; SCHNEIDER, C.M.; HAYWARD, R. Low-intensity exercise training during doxorubicin treatment protects against cardiotoxicity. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v.100, n.2, p.519-527, 2006.

CHUN, R. Lymphoma: which chemotherapy protocol and why? **Topics in Companion Animals Medicine**, Amsterdam, v.4, n.3, p.157-162, 2009.

CHUN, R.; LORIMIER, L.P. Update in the biology and management of canine osteosarcoma. **Veterinary Clinics of North America**, Philadelphia, v.33, n.3, p.491-516, 2003.

COLOMBO, T.; ZUCCHETTI, M.; D'INCALCI, M. Cyclosporin A markedly changes the distribution of doxorubicin in mice and rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.269, n.1, p.22-27, 1994.

DAL FARRA, M.C.T.; DIAS, M.A.; CAMACHO, A.A.; SANTANA, A.E. Estudo dos efeitos cardiotoxicos em cães tratados com doxorubina (Adribastina). In: XV Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: 1993. p. 114.

DAL FARRA, M.C.T.; CAMACHO, A.A.; DIAS, M.A.; SANTANA, A.E. Estudo dos efeitos cardiotoxicos em cães tratados com doxorubina (Adriblastina). **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v. 11, n. 1, p. 6-16, 1995.

DAS, A.; DURRANT, D.; MITCHELL, C.; MAYTON, E.; HOKE, N.N.; SALLOUM, F.N.; PARK, M.A.; QURESHI, I.; LEE, R.; DENT, P.; KUKREJA, R.C. Sildenafil increases chemotherapeutic efficacy of doxorubicin in prostate cancer and ameliorates cardiac dysfunction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.107, n.42, p.18202-18207, 2010.

DE MADRON, E. Assessment of diastolic function. In: CHETBOUL, V., BUSSADORI, C., DE MADRON, E. **Clinical Echocardiography of the dog and cat**. St. Louis: Elsevier, 2016. p.127-138.

DIAS, M.A.; SANTANA, A.E.; DAL FARRA, M.C.T. ; CAMACHO, A.A. Study of the central and peripheral hematologic profile in normal dogs treated with doxorubicin (adriblastina). **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, São Paulo, v.14, n.2, p.235-241, 1997.

DOROSHOW, J.H. Effect of anthracycline antibiotics on oxigen radical formation in rat heart. **Cancer Research**, v.43, p.460-472, 1983.

DOUGHERTY, A.H.; NACCARELLI, G.V.; GRAY, E.L.; HICKS, C.H.; GOLDSTEIN, R.A. Congestive heart failure with normal systolic function. **The American Journal of Cardiology**, v.54, n.7, p.778-782, 1984.

DREIFUS, L.S.; AGARWAL, J.B.; BOTVINICK, E.H.; *et al.* Heart rate variability for risk stratification of life-threatening arrhythmias. American College of Cardiology Cardiovascular Technology Assessment Committee. **Journal of the American College of Cardiology**, v.22, n.3, p.948-950, 1993.

FARRAJ, A.K.; HAZARI, M.S.; CASCIO, W.E. The utility of the small rodent electrocardiogram in toxicology. **Toxicological Sciences**, v.121, n.1, p.11-30, 2011.

FERREIRA, W.L.; SOUZA, R.C.; A.; CAMACHO, A.A. High-resolution electrocardiography in dogs under doxorubicin-induced cardiomyopathy. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.60, p.1118-1122, 2008.

FISHER, P.W.; SALLOUM, F.; DAS, A.; HYDER, H.; KUKREJA, R.C. Phosphodiesterase-5 inhibition with sildenafil attenuates cardiomyocyte apoptosis and left ventricular dysfunction in a chronic model of doxorubicin cardiotoxicity. **Circulation**, v.111, n.13, p.1601-1610, 2005.

FONTES-SOUSA, A. P. N.; MOURA, C.; CARNEIRO, C. S.; TEIXEIRA-PINTO, A.; AREIAS, J. C.; LEITE-MOREIRA, A. F. Echocardiographic evaluation including tissue Doppler imaging in New Zealand white rabbits sedated with ketamine and midazolam. **The Veterinary Journal**, London, v. 181, p. 326-331, 2009.

FREY, T.G.; MANNELLA, C.A. The internal structure of mitochondria. **Trends in Biochemical Sciences**, v.25, n.7, p.319-324, 2000.

GAD S.H. Acute and chronic evaluation of the cardiovascular toxicity of drugs. In: ACOSTA Jr, D. **Cardiovascular Toxicology**. New York: Raven Press, 1992. p.21-43.

GAVA, F.N. **Indução da cardiomiopatia dilatada com doxorubicina em modelo experimental com coelhos**. 2011. 74f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Clínica Médica de Pequenos Animais) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2011.

GAVA, F.N. **Remodelamento do miocárdio na cardiomiopatia dilatada induzida com doxorubicina em coelhos**. 2014. 75f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – Clínica Médica de Pequenos Animais) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2014.

GAVA, F.N.; ZACCHÉ, E.; ORTIZ, E.M.; CHAMPION, T.; BANDARRA, M.B.; VASCONCELOS, R.O.; BARBOSA, J.C.; CAMACHO, A.A. Doxorubicin induced dilated cardiomyopathy in a rabbit model: an update. **Research in Veterinary Science**, Londres, v.94, n.1, p.115-121, 2013.

GERSHENSON, D.M., KAVANAGH, J.J., COPERLAND, L.J., EDWARDS, C.L., FREEDMAN, R.S., WHARTON, J.T. High-Dose Doxorubicin Infusion Therapy for Disseminated Mixed Mesodermal Sarcoma of the Uterus. **Cancer**, v.59, n.7, p.1264-1267, 1987.

GEWIRTZ, D.A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. **Biochemical Pharmacology**, v.57, n.7, p.727-741, 1999.

GOODWIN, J.K. Eletrocardiografia. In: TILLEY, L.P.; GOODWIN, J.K. **Manual de cardiologia para cães e gatos**. 3.ed. São Paulo: São Paulo, 2002. p.39-65.

GREEN, P.S.; LEEUWENBURGH, C. Mitochondrial dysfunction in an early indicator of doxorubicin-induced apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1588, n.1, p.94-101, 2002.

GROSSMANN, W. Diastolic dysfunction and congestive heart failure. **Circulation**, v.81, n.3, p.1-7, 1990.

HALESTRAP, A.P.; CLARKE, S.J.; JAVADOV, S.A. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion - a target for cardioprotection. **Cardiovascular Research**, v.61, n.3, p.372-385, 2004.

HALESTRAP, A.P.; MCSTAY, G.P.; CLARKE, S.J. The permeability transition pore complex: another view. **Biochimie**, v.84, n.2-3, p.153-166, 2002.

HE, L., XIAO, J., FU, H., XIAO, X., ZHANG, C., GU, Y., MA, Y. Effect of oxidative stress on ventricular arrhythmia in rabbits with Adriamycin-induced cardiomyopathy. **Journal of Huazhong University of Science and Technology – Medical Sciences**, v.32, n.3, p.334-339, 2012.

HUIKURI, H.V.; STEIN, P.K. Heart Rate Variability in Risk Stratification of Cardiac Patients. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v.56, n.2, p.153-159, 2013.

JOVANOVIĆ, D.; JOVOVIĆ, D.; MIHAILOVIĆ-STANOJEVIĆ, N.; MILORADOVIĆ, Z.; NAUMOVIĆ, R.; DIMITRIJEVIĆ, J.; MAKSIC, N.; DJUKANOVIĆ, L. Effect of carvedilol on pulse pressure and left ventricular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats with adriamycin nephropathy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.63, n.8, p.571-576, 2009.

KAWAGUCHI, T.; TAKEMURA, G.; KANAMORI, H.; TAKEYAMA, T.; WATANABE, T.; MORISHITA, K.; OGINO, A.; TSUJIMOTO, A.; GOTO, K.; MATUYAMA, R.; KAWASAKI, M.; MIKAMI, A.; FUJIWARA, T.; FUJIWARA, H.; MINATOBUCHI, S. Prior starvation mitigates acute doxorubicin cardiotoxicity through restoration of autophagy in affected cardiomyocytes. **Cardiovascular Research**, v.96, n.3, p.456-465, 2012.

KIM, Y.H.; PARK, S.M.; KIM, M.; KIM, S.H.; LIM, S.Y.; AHN, J.C.; SONG, W.H.; SHIM, W.J. Cardioprotective effects of rosuvastatin and carvedilol on delayed cardiotoxicity of doxorubicin in rats. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v.22, n.6, p.488-498, 2012.

KLIMTOVÁ, I., SIMUNEK, T., MAZUROVÁ, Y., HRDINA, R., GERSL, V. Comparative study of chronic toxic effects of daunorubicin and doxorubicin in rabbits. **Human & Experimental Toxicology**, Hampshire, v.21, p. 649-657, 2002.

KOKA, S.; KUKREJA, R.C. Attenuation of doxorubicin-induced cardiotoxicity by tadalafil – a long acting phosphodiesterase-5 inhibitor. **Molecular and Cellular Pharmacology**, v.2, n.5, p.173-178, 2010.

KOKA, S.; DAS, A.; ZHU, S.G.; DURRANT, D.; XI, L.; KUKREJA, R.C. Long-acting phosphodiesterase-5 inhibitor tadalafil attenuates doxorubicin-induced cardiomyopathy without interfering with chemotherapeutic effect. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.334, n.3, p.1023-1030, 2010.

KOWALTOWSKI, A.J.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A.E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Letters**, n.495, v.1-2, p.12-15, 2001.

KRAMER, J.H.; WEGLICKI, W.B. A hydroxylated analog of the  $\beta$ -adrenoreceptor antagonist, carvedilol, affords exceptional antioxidant protection to postischemic rat hearts. **Free Radical Biology & Medicine**, n.21, v.6, p.813-825, 1996.

KUNG, G.; KONSTANTINIDIS, K.; KITSIS, R.N. Programmed necrosis, not apoptosis, in the heart. *Circulation Research*, v.108, n.8, p.1017-1036, 2011.

LAI, R.; LONG, Y.; LI, Q.; ZHANG, X.; RONG, T. Oxidative stress markers may not be early markers of doxorubicin-induced cardiotoxicity in rabbits. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v.2, n.5, p.947-950, 2011.

LEOMIL-NETO, M.; BALIEIRO, J.C.C; PEREIRA, E.C.S.; PEREIRA, G.G.; OLIVEIRA, V.M.; LARSSON, M.H.M.A. Clínica de cães com cardiomiopatia dilatada idiopática, tratados ou não com carvedilol. **Ciência Rural**, v.41, n.4, p.653-659, 2011.

LI, X.; HUANG, C.X.; JIANG, H.; CAO, F.; WANG, T. The beta-adrenergic blocker carvedilol restores L-type calcium current in a myocardial infarction model of rabbit. **Chinese Medical Journal**, v.118, n.5, p.377-382, 2005.

LONCAR-TURUKALO, T.; VASIC, M.; TASIC, T.; MIJATOVIC, G.; GLUMAC, S.; BAJIC, D.; JAPUNZIC-ZIGON, N. Heart rate dynamics in doxorubicin-induced cardiomyopathy. **Physiological Measurement**, v.36, n.4, p.727-739, 2015.

MANSOUR, M. A., EL-KASHEF, H.A., AL-SHABANAH, O.A. Effect of captopril on doxorubicin-induced nephrotoxicity in normal rats. **Pharmacological Research**, v.39, n.3, p.233-237, 1999.

MARCONDES-SANTOS, M.; TARASOUTCHI, F.; MANSUR, A.P; STRUNZ, C.M.C. Effects of Carvedilol Treatment in Dogs with Chronic Mitral Valvular Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.21, n.5, p.996-1001, 2007.

MARECHAL, X.; MONTAIGNE, D.; MARCINIAK, C.; MARCHETTI, P.; HASSOUN, S.M.; BEAUVILLAIN, J.C.; LANCEL, S.; NEVIERE, R. Doxorubicin-induced cardiac dysfunction is attenuated by ciclosporin treatment in mice through improvements in mitochondrial bioenergetics. **Clinical Science**, v.121, p.405-413, 2011.

MATSUI, H.; MORISHIMA, I.; NUMAGUCHI, Y.; TOKI, Y.; OKUMURA, K.; HAYAKAWA, T. Protective effects of carvedilol against doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. **Life Sciences**, v.65, n.12, p.1265-1274, 1999.

MAULDIN, G.E.; FOX, P.R.; PATNAIK, A.K.; BOND, B.R.; MOONEY, S.C.; MATUS, R.E. Doxorubicin-induced cardiotoxicosis: clinical features in 32 dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v.6, n.2, p.82-88, 1992.

MCDICKEN, W.N.; SUTHERLAND, G.R.; MORAN, C.M.; GORDON, L.N. Colour Doppler velocity imaging of the myocardium. **Ultrasound in Medicine & Biology**, New York, v.18, n.6-7, p.651-654, 1992.

MOGUILEVSKI, V.; OLIVER, J., MCGRATH, B.P. Sympathetic regulation in rabbits with heart failure: experience using power spectral analysis of heart rate variability. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v.22, n.6-7, p.475-477, 1995.

MONTAIGNE, D.; MARECHAL, X.; BACCOUCH, R.; MODINE, T.; PREAU, S.; ZANNIS, K.; MARCHETTI, P.; LANCEL, S.; NEVIERE, R. Stabilization of mitochondrial membrane potential prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity in isolated rat heart. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.244, n.3, p.300-307, 2010.

MONTAIGNE, D.; MARECHAL, X.; PREAU, S.; BACCOUCH, R.; MODINE, T.; FAYAD, G.; LANCEL, S.; NEVIERE, R. Doxorubicin induces mitochondrial permeability transition and contractile dysfunction in the human myocardium. **Mitochondrion**, v.11; p.22-26, 2011.

MUCHA, C.J. Electrocardiografia ambulatoria y de contacto. In: BELERENIAN, G.; MUCHA, C.J.; CAMACHO, A.A. et al. **Afecciones cardiovasculares en pequeños animales**. 2.ed. Buenos Aires: Inter-médica, 2007. p.121-128.

MYERS, C. E.; BONOW, R.; PALMERI, S.; JENKINS, J.; CORDEN, B.; LOCKER, G.; DOROSHOW, J.; EPSTEIN, S. A randomized controlled trial assessing the prevention of doxorubicin cardiomyopathy by *N*-acetylcysteine. **Seminars in Oncology**, v.10, suppl.1, p.53-55, 1983.

MYRENG, Y.; SMISETH, O. A. Assessment of Left Ventricular Relaxation by Doppler Echocardiography. Comparison of isovolumic relaxation time and transmitral flow velocities with time constant of isovolumic relaxation. **Circulation**, Dallas, v. 81, n. 1, p. 260-266, 1990.

NAKAGE, A.P.M.; SANTANA, A.E.; DIAS, M.A.; CAMACHO, A.A. Estudo dos efeitos da doxorubicina com relação às funções hepática e renal em cães saudáveis. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v.15, n.1, p.01-06, 1999.

NAZARETH, W.; YAFEI, N.; CROMPTON, M. Inhibition of anoxia-induced injury in heart myocytes by cyclosporin A. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.23, n.12, p.1351-1354, 1991.

NEILAN, T.G.; JASSAL, D.S.; PEREZ-SANZ, T.M.; RAHER, M.J.; PRADHAN, A.D.; BUYS, E.S.; ICHINOSE, F.; BAYNE, D.B.; HELPERN, E.F.; WEYMAN, A.E.; DERUMEAUX, G.; BLOCH, K.D.; PICARD, M.H.; SCHERRER-CROSBIE, M. Tissue Doppler imaging predicts left ventricular dysfunction and mortality in a murine model of cardiac injury. **European Heart Journal**, Londres, v.27, n.15, p.1868-1875, 2006.

OCKAILI, R.; SALLOUM, F.; HAWKINS, J.; KUKREJA, R.C. Sildenafil (Viagra) induces powerful cardioprotective effect via opening of mitochondrial K(ATP) channels in rabbits. **American Journal of Physiology. Heart and Circulation Physiology**, v.283, n.3, p.H1263-H1269, 2002.

OLIVEIRA, P.J.; BJORK, J.A.; SANTOS, M.S.; LEINO, R.L.; FROBERG, M.K.; MORENO, A.J.; WALLACE, K.B. Carvedilol-mediated antioxidant protection against doxorubicin-induced cardiac mitochondrial toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.200, n.2, p.159-168, 2004.

ONG, S.B.; HAUSENLOY, D.J. Mitochondrial morphology and cardiovascular disease. **Cardiovascular Research**, v.88, n.1, p.16-29, 2010.

OYAMA, M.A.; SISSON, D.D.; PROSEK, R.; BULMER, B.J.; LUETHY, M.W.; FUENTES, V.L. Carvedilol in Dogs with Dilated Cardiomyopathy. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.21, n.6, p.1272-1279, 2007.

PAPADOPOULOU, L. C., THEOPHILIDIS, G., THOMOPOULOS, G.N., TSIFTSOGLU, A.S. Structural and functional impairment of mitochondria in adriamycin-induced cardiomyopathy in mice: suppression of cytochrome c oxidase II gene expression. **Biochemical Pharmacology**, v.57, n.5, p.481-489, 1999.

PATÁCOVÁ, A.; ADAMCOVÁ, M.; CAJNÁKOVÁ, H.; HRBATOVÁ, L.; STERBA, M.; POPELOVÁ, O.; SIMUNEK, T.; PONKA, P.; GERSL, V. Evaluation of ECG time intervals in a rabbit model of anthracycline-induced cardiomyopathy: a useful tool for assessment of cardioprotective agents. **Physiological Research**, Praha, v.56, n.2, p.251-254, 2007.

PEREIRA, E.Z. **Parâmetros ecocardiográficos e variabilidade da frequência cardíaca em fêmeas caninas com sepse de ocorrência natural devido à piometra e suas correlações com valores séricos de TNF-alfa, IL-1beta, IL-6, IL-10 e proteína C reativa**. 2015. 87f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária - Clínica Médica de Pequenos Animais) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal, São Paulo, 2015.

PEREIRA NETO, G.B.; ANDRADE, J.N.B.; SOUSA, M.G.; CAMACHO, A.A. Holter electrocardiography in dogs showing doxorubicin-induced dilated cardiomyopathy. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n.6, p.1037-1042, 2006.

PONTES, J.C.; GOMES JÚNIOR, J.F.; SILVA, G.V.; BENFATTI, R.A.; DIAS, A.E.; DUARTE, J.J.; GARDENAL, N.; ODASHIRO, M.; SANTOS, C.H. Anatomopathological study of cardiomyopathy induced by doxorubicin in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.25, n.2, p.137-143, 2010.

RAHMAN, A.M.; YUSUF, S.W.; EWER, M.S. Anthracycline-induced cardiotoxicity and the cardiac-sparing effect of liposomal formulation. **International Journal of Nanomedicine**, v.2, n.4, p.567-583, 2007.

REIS, C.C.V., CAMACHO, A.A., GAVA, F.N., ZACCHÉ, E., ORTIZ, E.M.G. Avaliação de parâmetros hematológicos da indução da cardiomiopatia dilatada com doxorubicina em modelo experimental com coelhos. **XXII Congresso de Iniciação Científica – UNESP**, p.1089-1082, 2010.

ROHDE, L.E.; BALDI, A.; WEBER, C.; GEIB, G.; MAZZOTTI, N.G.; FIORENTINI, M.; ROGGIA, M.; PEREIRA, R.; CLAUSELL, N. Tei index in adult patients submitted to adriamycin chemotherapy: failure to predict early systolic dysfunction. Diagnosis of adriamycin cardiotoxicity. **The International Journal of Cardiovascular Imaging**, v.23, n.2, p.185-191, 2007.

ROSCA, M.G.; HOPPEL, C.L. Mitochondria in heart failure. **Cardiovascular Research**, v.88, n.1, p.40-50, 2010.

SANTOS, D.L.; MORENO, A.J.M.; LEINO, R.L.; FROBERG, M.K.; WALLACE, K.B. Carvedilol protects against doxorubicin-induced mitochondrial cardiomyopathy. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.185, n.3, p.218-227, 2002.

SCHAPER, J.; EISER, E.; STAMMLER, G. Ultrastructural morphometric analysis of myocardium from dogs, rats, hamsters, mice, and from human hearts. **Circulation Research**, Baltimore, v.56, n.3, p.377-391, 1985

SCHWARZ, E.R.; POLLICK, C; DOW, J.; PATTERSON, M.; BIRNBAUM, Y.; KLONER, R.A. A small animal model of non-ischemic cardiomyopathy and its evaluation by transthoracic echocardiography. **Cardiovascular Research**, v.39, n.1, p.216-223, 1998.

SENJU, N.; IKEDA, S.; KOGA, S.; MIYAHARA, Y.; TSUKASAKI, K.; TOMONAGA, M.; KOHNO, S. The echocardiographic Tei-index reflects early myocardial damage induced by anthracyclines in patients with hematological malignancies. **Heart Vessels**, v.22, n.6, p.393-397, 2007.

SILVA, C.E.V.; CAMACHO, A.A.; NAKAGE, A.P.M.; SANTANA, A.E.; CANOLA, J.C. Efeitos cardiovasculares, hematológicos e bioquímicos do tratamento crônico experimental com doxorubicina em cães. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v.20, n.2, p.185-194, 2004.

SILVA, C.E.V.; CAMACHO, A.A. Alterações ecocardiográficas em cães sob tratamento prolongado com doxorubicina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 3, p. 300-306, 2005.

SIMUNEK, T.; KLIMTOVÁ, I.; KAPLANOVÁ, J.; MAZUROVÁ, Y.; ADAMCOVÁ, M.; STERBA, M.; HRDINA, R.; GERSL, V. Rabbit model for in vivo study of anthracycline-induced heart failure and for the evaluation of protective agents. **European Journal Heart Failure**, Oxford, v.6, n.4, p.377-387, 2004.

SIMUNEK, T.; STÉRBA, M.; POPELOVÁ, O.; ADAMCOVÁ, M.; HRDINA, R.; GERSL, V. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. **Pharmacological Reports**, v.61, n.1, p.154-171, 2009.

SINGAL, P.K.; DEALLY, C.M.R.; WEINBERG, L.E. Subcellular effects of adriamycin in the heart: a concise review. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.19, n.8, p.817-828, 1987.

SMITH, D.N.; SCHOBBER, K.E. Effects of vagal maneuvers on heart rate and Doppler variables of the left ventricular filling in healthy cats. **Journal of Veterinary Cardiology**, Bern, v.15, n.1, p.33-40, 2013.

SOUSA, M. G. **Função cardíaca de cães submetidos ao transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas em dois modelos experimentais de cardiomiopatia**. 2007. 128f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária - Clínica Médica de Pequenos Animais) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal, São Paulo, 2007.

SOUZA, R.C.A.; CAMACHO, A.A. Neurohormonal, hemodynamic, and electrocardiographic evaluations of healthy dogs receiving long-term administration of doxorubicin. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 67, n. 8, p.1319-1325, 2006.

SPALLAROSSA, P.; GARIBALDI, S.; ALTIERI, P.; FABBI, P.; MANCA, V.; NASTI, S.; ROSSETTIN, P.; GHIGLIOTTI, G.; BALLESTRERO, A.; PATRONE, F.; BARSOTTI, A.; BRUNELLI, C. Carvedilol prevents doxorubicin-induced free radical release and apoptosis in cardiomyocytes in vitro. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.37, p.837-846, 2004.

STYPMANN, J.; ENGELEN, M.A.; BREITHARDT, A.K.; MILBERG, P.; ROTHENBURGER, M.; BREITHARDT, O.A.; BREITHARDT, G.; ECKARDT, L.; CORDULA, P.N. Doppler echocardiography and tissue doppler imaging in the healthy rabbit: Differences of cardiac function during awake and anaesthetised examination. **International Journal of Cardiology**, Amsterdam, v. 115, p. 164-170, 2007.

SUSANECK, S.J. Doxorubicin therapy in the dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.182, n.1, p.70-72, 1983.

SUSIN, S. A.; LORENZO, H. K.; ZAMZAMI, N.; MARZO, I.; BRENNER, C.; LAROCLETTE, N.; PREVOST, M. C.; ALZARI, P. M; KROEMER, G. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v.189, n.2, p.381-394, 1999.

TAKEMURA, G.; FUJIWARA, H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v.49, n.5, p.330–352, 2007.

TASSAN-MANGINA, S.; CODOREAN, D.; METIVIER, M.; COSTA, B.; HIMBERLIN, C.; JOUANNAUD, C. BLAISE, A. M.; ELAERTS, J.; NAZEYROLLAS, P. Tissue Doppler imaging and conventional echocardiography after anthracycline treatment in adults: early and late alterations of left ventricular function during a prospective study. **European Journal of Echocardiography**, London, v. 7, n. 2, p. 141-146, 2006.

TEI, C.; LING, L.H.; HODGE, D.O.; BAILEY, K.R.; OH, J.K.; RODEHEFFER, R.J.; TAJIK, A.J.; SEWARD, J.B. New index of combined systolic and diastolic myocardial performance: a simple and reproducible measure of cardiac function – a study in normal and dilated cardiomyopathy. **Journal of Cardiology**, Okayama, v.26, n. 6, p. 357-366, 1995.

TILLEY, P.T. **Essentials of canine and feline electrocardiography**. 3.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. 470 p.

TOYODA, Y.; OKADA, M.; KASHEM, M. A. A canine model of cardiomyopathy induced by repetitive intracoronary doxorubicin administration. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, Saint Louis, v. 115, n. 6, p. 1367-1373, 1998.

UNVERFERTH, D. V.; LEIER, C. V.; BALCERZAK, S. P.; HAMLIN, R. L. Usefulness of a free radical scavenger in preventing doxorubicin-induced heart failure in dogs. **The American Journal of Cardiology**, v.56, n.1, p.157-161, 1985.

VAN VLEET, J. F., GREENWOOD, L., FERRANS, V.L., REBAR, A.H. Effect of selenium-vitamin E and adriamycin induced cardiomyopathy in rabbits. **American Journal Veterinary Research**, v.9, p.997-1010, 1978.

VIANA, F.A.B. Guia terapêutico veterinário. 2.ed. Lagoa Santa: Cem, 2007. 463 p.

VILARDO, F.E.S. Lagomorpha (Coelho, Lebre e Lebre-assobiadora). In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. Tratado de animais selvagens. Medicina Veterinária. 1.ed. São Paulo: Roca, 2007. 1354 p.

WHEREAT, A., F.; ORISHIMO, M. W.; NELSON, J. The location of different synthetic systems for fatty acids in inner and outer mitochondrial membranes from rabbit heart **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 244, n. 23, p. 6498-506, 1969.

WREDENBERG, A.; WIBOM, R.; WILHELMSSON, H.; GRAFF, C.; WIENER, H.H.; BURDEN, S.J.; OLDFORS, A.; WESTERBLAD, H.; LARSSON, N.G. Increased mitochondrial mass in mitochondrial myopathy mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.99, n.23, p.15066-15041, 2002.

YUE, T.L.; MCKENNA, P.J.; RUFFOLO JR., R.R.; FEUERSTEIN, G. Carvedilol, a new beta-adrenoreceptor antagonist and vasodilator antihypertensive drug, inhibits superoxide release from human neutrophils. **European Journal of Pharmacology**, v.214, n.2-3, p.277-280, 1992.

ZACCHÉ, E.; GAVA, F.N.; ORTIZ, E.M.G.; CHAMPION, T.; CAMACHO, A.A. Bradicardia induced by partial nasal obstruction by digital compression in non-sedated rabbits. P.658. ACVIM 2011. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Denver, v.25, p.658, 2011.

ZHOU, S.; STARKOV, A.; FROBERG, M.K.; LEINO, R.L.; WALLACE, K.B. Cumulative and irreversible cardiac mitochondrial dysfunction induced by doxorubicin. **Cancer Research**, v.61, p.771-777, 2001.

ZILE, M.R.; BRUTSAERT, D.L. New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: Part II: causal mechanisms and treatment. **Circulation**, v.105, n.12, p.1503-1508, 2002.

## APÊNDICES

**Valores de referência para parâmetros hematológicos em coelhos**

<b>Parâmetro</b>	<b>Unidade</b>	<b>Intervalo de referência</b>
Hemácias	L 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	5,2 a 6,8
Hematócrito	%	35,0 a 45,0
Hemoglobina	g/dL	10,0 a 15,0
Leucócitos	x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	2,5 a 12,5
Plaquetas	L 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	250 a 610

\* Adaptado de CAMPBELL (2015b), VIANA (2007) e VILARDO (2007).

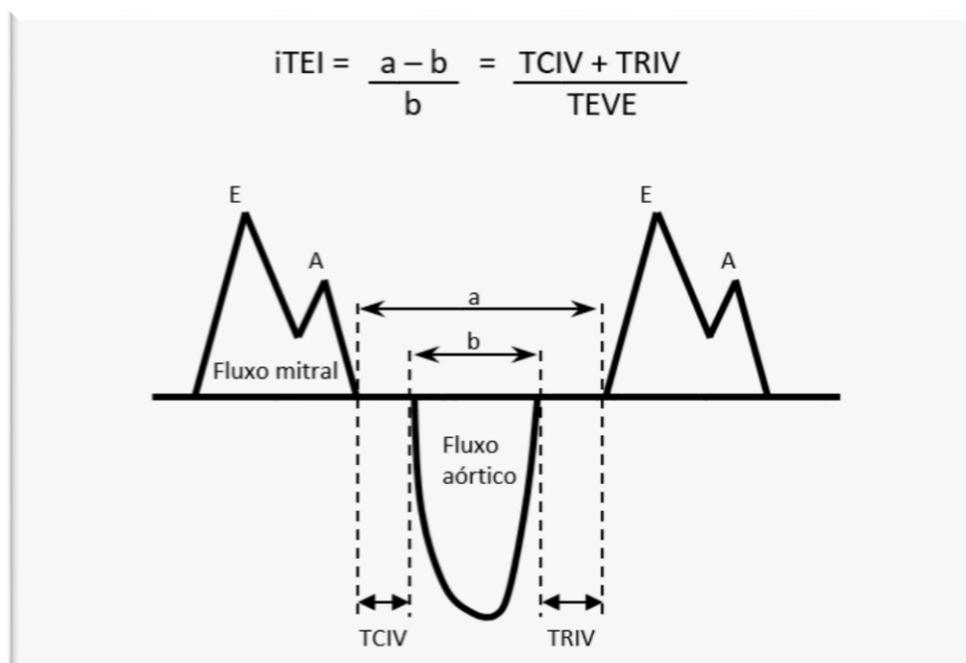
**Valores de referência para parâmetros bioquímicos séricos em coelhos**

<b>Parâmetro</b>	<b>Unidade</b>	<b>Intervalo de referência</b>
ALT	UI/L	48 a 80
AST	UI/L	14 a 113
Uréia	mg/dL	13 a 50
Creatinina	mg/dL	0,5 a 2,5

\* Adaptado de CAMPBELL (2015a), VIANA (2007) e VILARDO (2007).

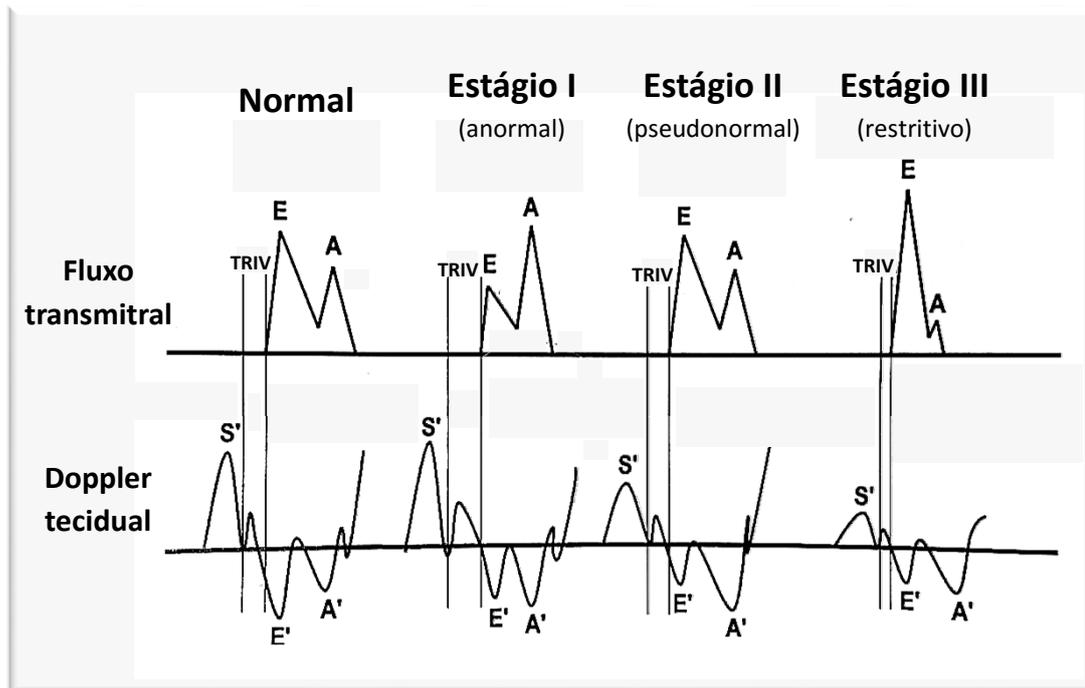
**Fórmula para o cálculo da fração de encurtamento (FEC%) pelo método de Teichholz.**

$$\text{FEC\%} = \frac{\text{DIVEd} - \text{DIVEs}}{\text{DIVEd}} \times 100$$

**Fórmula para o cálculo do índice de desempenho miocárdico de Tei (ITEI)**

\* Adaptado de BOON, 2011. ITEI: Índice miocárdico de Tei; TCIV: tempo de contração isovolumétrica; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; TEVE: tempo de ejeção do ventrículo esquerdo.

### Cr terios para classifica o da fun o diast lica



\* Adaptado de BOON, 2011 e DE MADRON, 2016.