

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**AÇÃO DO LASSBio 294 SOBRE PARÂMETROS  
CARDIOVASCULARES EM MODELO EXPERIMENTAL DE  
CARDIOMIOPATIA DILATADA EM COELHOS**

Ana Paula Araújo Costa

Orientadora: Profa. Dra. Rosângela de Oliveira Alves Carvalho

GOIÂNIA

2016



**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1                    **1. Identificação do material bibliográfico:**            ☐ Dissertação            ☒ Tese

1                    **2. Identificação da Tese ou Dissertação**

2

Nome completo do autor:

Título do trabalho:

**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM            ☐ NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Paula Araújo Costa  
Assinatura do (a) autor (a) <sup>2</sup>

Data: 09 / 02 / 17

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

<sup>2</sup> A assinatura deve ser escaneada.

ANA PAULA ARAÚJO COSTA

**AÇÃO DO LASSBio 294 SOBRE PARÂMETROS  
CARDIOVASCULARES EM MODELO EXPERIMENTAL DE  
CARDIOMIOPATIA DILATADA EM COELHOS**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor  
em Ciência Animal junto à Escola de Veterinária e  
Zootecnia da Universidade Federal de Goiás

**Área de Concentração:**

Clínica, Cirurgia e Patologia

**Linha de pesquisa:**

Alterações clínicas, metabólicas e toxêmicas dos  
animais e meios auxiliares de diagnóstico

**Orientadora:**

Profa. Dra. Rosângela de Oliveira Alves Carvalho –  
EVZ/UFG

**Comitê de Orientação:**

Profa. Dra. Veridiana Maria Brianezi Dignani de  
Moura – EVZ/UFG

Profa. Dra. Valéria de Oliveira - FF/UFG

GOIÂNIA

2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do  
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Araujo Costa, Ana Paula  
AÇÃO DO LASSBio 294 SOBRE PARÂMETROS  
CARDIOVASCULARES EM MODELO EXPERIMENTAL DE  
CARDIOMIOPATIA DILATADA EM COELHOS [manuscrito] / Ana  
Paula Araujo Costa. - 2016.  
XVIII, 100 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Rosângela de Oliveira Alves Carvalho; co  
orientadora Dra. Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura; co  
orientador Dr. Valéria de Oliveira.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de  
Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal, Goiânia, 2016.

Bibliografia. Anexos.

Inclui fotografias, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras,  
lista de tabelas.

1. Insuficiência cardíaca. 2. Leporino. 3. Inodilatador. 4.  
Vasodilatador. 5. Cardiotônico. I. de Oliveira Alves Carvalho, Rosângela,  
orient. II. Título.

CDU 639.09

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



1 ATA NÚMERO 240 DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DO PROGRAMA DE PÓS-  
2 GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA  
3 UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, REALIZADA POR Ana Paula Araújo Costa. Às  
4 14h00min do dia 16/12/2016, reuniu-se na Sala de Defesas do Programa de Pós-Graduação em  
5 Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Campus II  
6 Samambaia, nesta Capital Goiânia - Goiás, a Comissão Julgadora infra nomeada para proceder ao  
7 julgamento da Defesa de Tese de Doutorado apresentado (a) pelo (a) Pós-Graduando (a) Ana Paula  
8 Araújo Costa, intitulada "Ação do LASSBio 294 sobre os parâmetros cardiovasculares em  
9 modelo experimental de cardiomiopatia dilatada em coelhos", apresentada para obtenção do  
10 Título de Doutor em Ciência Animal, junto à Área de Concentração: Patologia, Clínica e  
11 Cirurgia Animal desta Universidade. O Presidente da Comissão Julgadora Profa. Dra. Rosângela  
12 de Oliveira Alves Carvalho, iniciando os trabalhos, concedeu a palavra ao (a) candidato (a) Ana  
13 Paula Araújo Costa para exposição em cinquenta minutos do seu trabalho. A seguir, o senhor  
14 Presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos Examinadores, os quais passaram a  
15 arguir o (a) candidato (a), durante o prazo máximo de vinte minutos, assegurando-se ao mesmo  
16 igual prazo para responder aos Senhores Examinadores. Ultimada a arguição, que se desenvolveu  
17 nos termos regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o  
18 (a) candidato (a) **Aprovado (a) ou Reprovado (a):**

19 Profa. Dra. Rosângela de Oliveira Alves Carvalho

Aprovada

20 Profa. Dra. Andréa Cintra Bastos Tôres Passos

Aprovada

21 Profa. Dra. Kátia Mitsube Tárraga

Aprovada

22 Profa. Dra. Aline Maria Vasconcelos Lima

Aprovada

23 Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo

Aprovada

24 Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o (a) candidato (a) Ana Paula  
25 Araújo Costa, Habilitada [(Habilitado (a) ou não Habilitado (a)) pelo(s)  
26 motivo(s) abaixo exposto(s):

27 \_\_\_\_\_  
28 \_\_\_\_\_  
29 \_\_\_\_\_  
30 \_\_\_\_\_  
31 \_\_\_\_\_  
32 \_\_\_\_\_

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



33

34

35

36

37

38 A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da tese:

39

40

41

42

43

44

45 Nada mais havendo a tratar, eu **Profa. Dra. Rosângela de Oliveira Alves Carvalho**, lavrei a  
46 presente ata que, após lida e achada conforme foi por todos assinada.

47 Profa. Dra. Rosângela de Oliveira Alves Carvalho

48 Profa. Dra. Andréa Cintra Bastos Tórres Passos

49 Profa. Dra. Kátia Mitsube Tárraga

50 Profa. Dra. Aline Maria Vasconcelos Lima

51 Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo

*Carvalho*  
*Andréa Cintra Bastos Torres Passos*  
*Kátia Mitsube Tárraga*  
*Aline Vasconcelos*  
*Eugênio*

À todos os animais que um dia  
deram suas vidas em prol da ciência

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar, por acalmar nossas angústias e a quem nunca devemos esquecer de agradecer pelas nossas conquistas.

Aos meus pais, Wagner Leão Costa e Eliane Alves de Araújo, por estarem sempre presentes, e por incentivarem os estudos de seus filhos, comemorando cada vitória e confortando em cada obstáculo.

Aos meus irmãos, Wagner Leão Costa Filho e Ana Clara Araújo Costa, além de irmãos, são meus modelos de profissionalismo e sucesso. Também aos demais familiares, por estarem sempre presentes e por comemorarem cada conquista minha até o momento.

À orientadora e amiga, Profa. Dra. Rosângela de Oliveira Alves Carvalho, por me oferecer a oportunidade e por acreditar que eu seria capaz de executar um projeto que até então fazia parte de uma especialidade ainda não explorada por mim, em minha carreira como médica veterinária. Você é e sempre será a médica veterinária e professora que me espelharei como profissional.

Às professoras Dra. Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura e Dra. Valéria Oliveira, por suas contribuições como co-orientadoras deste projeto e aos professores Dra. Aline Vasconcelos; Dra. Ana Paula Santin, Dr. Eugênio Araújo, Dra. Andréa Cintra e Dra. Kátia Tarraga, que aceitaram participar das minhas bancas de qualificação e defesa do título de doutora em Ciência Animal e cuja colaboração sei que será fundamental para enriquecer a presente tese.

Aos meus mestres, em especial à Profa. Dra. Naida Cristina Borges, minha eterna orientadora, e aos demais médicos veterinários e funcionários do Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG, pelo conhecimento transmitido durante a graduação, residência, mestrado e doutorado, e a EVZ, pelo ensino e infraestrutura de qualidade.

Agradecimento especial ao técnico do laboratório da pós graduação, Helton Freires de Oliveira, pela colaboração nas análises dos exames hematológicos e bioquímicos deste estudo.

Às minhas amigas e colegas de profissão Andréa Cintra e Priscilla Nasciutti, cuja amizade e confiança foram de fundamental importância durante todo meu curso de doutorado. Aos meus estagiários, colegas de pós graduação e amigos Bruna Dantas, Nayara Gonçalves, Thaiz Krawczyk, Gabriel Moreno, Aline Moraes, Evelyn Mayara, Jéssica Vieira, Gabriela



Canedo, Fernanda Carvalho, Carla Amorim e Rogério Vieira, pela ajuda e sem os quais a execução deste projeto não seria possível.

Ao CNPq, órgão financiador do presente estudo e da minha bolsa de doutorado.

E, por último, mas não menos importantes, aos coelhos (Tutus) que compuseram o grupo experimental deste estudo.

**Muito obrigada!!!**

“A vida sem ciência é  
uma espécie de morte”

**Sócrates**

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....	1
1. CARDIOMIOPATIA DILATADA.....	1
2. MODELOS EXPERIMENTAIS DE CARDIOMIOPATIA DILATADA .....	7
3. CANDIDATO A FÁRMACO CARDIOTÔNICO LASSBio 294.....	9
4. OBJETIVOS.....	12
4.1 Objetivo geral .....	12
4.2 Objetivos específicos.....	12
REFERÊNCIAS .....	13
CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DE MODELO EXPERIMENTAL DE CARDIOMIOPATIA DILATADA INDUZIDA POR DOXORRUBICINA EM COELHOS: VANTAGENS E DESVANTAGENS .....	17
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
2.1 Animais e Indução da Cardiomiopatia Dilatada.....	19
2.2 Avaliação eletrocardiográfica.....	20
2.3 Avaliação ecodopplercardiográfica .....	20
2.4 Mensuração da pressão arterial .....	21
2.5 Avaliação radiográfica do tórax .....	22
2.6 Avaliação hematológica e bioquímica.....	23
2.7 Avaliação anatomopatológica.....	25
2.8 Análise estatística .....	25
3. RESULTADOS .....	25
3.1 Mortalidade.....	25
3.2 Avaliação anatomopatológica.....	26
3.3 Avaliação eletrocardiográfica.....	27
3.4 Avaliação ecodopplercardiográfica .....	28
3.5 Mensuração da pressão arterial .....	31
3.6 Avaliação radiográfica do tórax .....	32
3.7 Parâmetros bioquímicos e hematológicos .....	34
4. DISCUSSÃO .....	36
5. CONCLUSÕES .....	42
REFERÊNCIAS .....	43
CAPÍTULO 3 – AÇÃO DO LASSBIO 294 SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR DE COELHOS COM CARDIOMIOPATIA DILATADA EXPERIMENTALMENTE INDUZIDA POR DOXORUBICINA .....	47
1. INTRODUÇÃO.....	48
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
2.1 Farmacocinética do LASSBio 294 em coelhos .....	50
2.2 Delineamento experimental.....	51
2.2.1 Avaliação eletrocardiográfica.....	52
2.2.2 Avaliação ecodopplercardiográfica .....	52

2.2.3 Mensuração da pressão arterial.....	53
2.2.4 Avaliação radiográfica do tórax .....	54
2.2.5 Avaliação hematológica e bioquímica.....	55
2.2.6 Avaliação anatomopatológica .....	57
2.2.7 Análise estatística .....	57
3. RESULTADOS .....	58
3.1 Estudo farmacocinético e dos metabólitos do LASSBio 294 em coelhos.....	58
3.2 Ação do LASSBio 294 em coelhos com CMD .....	59
3.2.1 Mortalidade.....	59
3.2.2 Avaliação clínica .....	60
3.2.3 Avaliação eletrocardiográfica.....	60
3.2.4 Avaliação Ecodopplercardiográfica .....	63
3.2.5 Mensuração da pressão arterial.....	71
3.2.6 Avaliação radiográfica do tórax .....	72
3.2.7 Avaliação hematológica e bioquímica.....	73
3.2.7 Avaliação anatomopatológica .....	78
4. DISCUSSÃO .....	83
5. CONCLUSÕES .....	90
REFERÊNCIAS .....	91
CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	96

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2

- FIGURA 1: Alterações macroscópicas observadas em coelhos Nova Zelândia submetidos a indução CMD por doxorubicina. Em A: Nota-se petéquias e sufusões (asterisco) e ruptura gástrica (seta). Em B: Nota-se sufusão (asterisco) e úlcera (seta) em mucosa gástrica.....26
- FIGURA 2: Fotomicrografias de tecido cardíaco de coelho Nova Zelândia saudável (A) e tratado com doxorubicina (B). B: Edema intersticial com perda de orientação das miofibrilas. Hematoxilina e Eosina. Objetiva: 20x. ....27
- FIGURA 3 - Traçados eletrocardiográficos computadorizados, derivação II, calibração 2N, velocidade 50mm/s, obtidos de coelhos da raça Nova Zelândia, antes da indução da cardiomiopatia dilatada (A) e aos 30 dias de tratamento com doxorubicina na dose cumulativa de 8mg/Kg (B). Na figura B a seta grande identifica um complexo QRS bizarro, caracterizando um complexo ventricular prematuro. ....28
- FIGURA 4: Imagens ecocardiográficas bidimensionais na parte superior e imagens em modo-M na parte inferior das figuras, obtidas pela janela paraesternal direita, de coelho Nova Zelândia, submetido a indução da cardiomiopatia dilatada com doxorubicina. Em A: Décimo quinto dia de indução, apresentando FS% de 33. Em B: Sexagésimo dia de indução, apresentando FS% de 23.....29
- FIGURA 4: Radiografia em projeção laterolateral direita de coelho Nova Zelândia antes da indução da cardiomiopatia dilata (A) e após desenvolvimento da CMD (B), ilustrando os traçados para cálculo do VHS. VHS em A de oito vertebrae e em B de dez vértebras. Nota-se aumento da radiopacidade pulmonar em B, caracterizando padrão intersticial difuso, sugerindo edema pulmonar e deslocamento dorsal da traqueia em B (seta), devido a cardiomegalia generalizada. ....33
- FIGURA 5: Espécime anatômico e imagem radiográfica torácica de coelho Nova Zelândia. Em A: Espécime anatômico identificando a gordura no mediastino (traçado) e diafragma (seta); B: Imagem radiográfica identificando o diafragma (seta). Observa-se pouca definição do limite cranial do coração, devido a gordura no mediastino cranial.....33

### CAPÍTULO 3

- FIGURA 1 - Perfil das concentrações plasmáticas após administração via oral de 2mg/kg do LASSBio-294 em coelhos Nova Zelândia hípidos (média  $\pm$  DP, n = 2).....58
- FIGURA 2 - Estrutura química do LASSBio-294 e seus metabólitos propostos, após administração oral de LASSBio-294 em coelhos Nova Zelândia.....59
- FIGURA 3 - Traçados eletrocardiográficos computadorizados, derivação II, calibração 2N, velocidade 50mm/s, obtidos de coelhos da raça Nova Zelândia, após da indução da cardiomiopatia dilatada e tratados com LASSBio 294. Em A nota-se taquicardia atrial, caracteriza pela presença de ondas P assimétricas e frequência cardíaca elevada. Na figura B a seta grande identifica um

- complexo QRS bizarro, caracterizando um complexo ventricular prematuro. ....61
- A variável DIVED, obtida por meio da avaliação do VE em modo-M, foi diferente entre os grupos nos momentos S1 e S2. A variável SIVd foi maior no grupo B, no momento S3. Houve diferenças nas médias calculadas da PLVED dentro do grupo B em S1 e SIVs dentro do grupo A, também em S1. Não houve diferenças significativas em relação ao índice sistólico FE entre os animais do grupo A e B, tampouco entre as médias obtidas nos diferentes momentos, dentro do mesmo grupo. A fração de encurtamento por outro lado, foi maior no momento dois, dentro do grupo A, porém não houve diferença entre os grupos. Em ambos os grupos observou-se aumento progressivo das FE% e FS% e queda dessas no 30º dia de tratamento (Figura 4). ....65
- FIGURA 4: Imagens ecocardiográficas bidimensionais na parte superior e imagens em modo-M na parte inferior das figuras, obtidas pela janela paraesternal direita, de coelho Nova Zelândia, submetido a indução da cardiomiopatia dilatada e tratado com LASSBio 294 na dose de 2mg/Kg. Em A: Antes do início do tratamento, apresentando FS de 16%. B: Segunda semana de tratamento com LASSBio 294 na dose de 2mg/Kg, apresentando FS de 36%. ....65
- FIGURA 5: Imagens ecocardiográficas em modo Doppler pulsado e Doppler tecidual, obtidas pela janela paraesternal esquerda, de coelhos Nova Zelândia, submetidos a indução da cardiomiopatia dilatada e tratados com LASSBio 294 (2mg/Kg) ou pimobendana (0,3mg/Kg). A: Doppler pulsado do fluxo transmitral apresentando relação  $E/A > 1$ . B: Doppler pulsado do fluxo transmitral apresentando relação  $E/A < 1$ . C: Doppler tecidual altura do anel mitral apresentando relação  $E'/A' > 1$ . D: Doppler tecidual altura do anel mitral apresentando relação  $E'/A' < 1$ . E: Tempo de relaxamento isovolumétrico normal (41-46ms). F: Tempo de relaxamento isovolumétrico aumentado (60ms). ....68
- FIGURA 6: Imagens ecocardiográficas em modo bidimensional e Doppler colorido de coelhos Nova Zelândia, submetidos a indução da cardiomiopatia dilatada e tratado com LASSBio 294 na dose de 2mg/Kg. Em A: Nota-se efusão pericárdica (EP) e efusão pleural (seta), caracterizado por acúmulo de conteúdo anecóico em saco pericárdico e cavidade torácica, imagem obtida pela janela paraesternal direita eixo longo. B: Nota-se insuficiência pulmonar trivial (seta), imagem obtida pela janela paraesternal direita eixo curto ao nível da artéria pulmonar. C: Nota-se insuficiência trivial de mitral (seta), imagem obtida pela janela paraesternal esquerda, vista apical quatro câmaras. ....69
- FIGURA 7: Radiografia em projeção laterolateral direita de coelho Nova Zelândia antes da indução da cardiomiopatia dilatada (A) e duas semanas após desenvolvimento da insuficiência sistólica (B) e tratado com LASSBio-294 (2mg/Kg). Nota-se aumento da radiopacidade pulmonar em B, caracterizando padrão intersticial difuso, sugerindo presença de edema pulmonar e deslocamento dorsal da traqueia (seta branca), devido à cardiomegalia generalizada, com aumento do contato do coração ao esterno (setas vermelhas), ainda percebe-se separação de lobos pulmonares, assumindo aspecto de folha, característico de efusão pleural (seta preta). ....73

- FIGURA 8 – Representação gráfica da concentração sérica de creatinina de coelhos submetidos a indução da CMD por doxorrubina e tratados com LASSBio 294 (2mg/Kg) (A) ou pimobendana (0,3mg/Kg) (B). Nota-se redução da concentração sérica de creatinina do grupo A à partir da terceira semana de tratamento, enquanto no grupo B essa redução somente foi observada na quarta semana de tratamento. ....78
- FIGURA 9: Alterações macroscópicas observadas em coelhos Nova Zelândia após indução da CMD por doxorubicina e tratados com LASSBio 294. Em A: Nota-se congestão hepática (asterisco) e efusão abdominal (seta). Em B: Nota-se efusão pleural (seta) e, em C, efusão pericárdica (seta).....79
- FIGURA 10: Corações de coelhos Nova Zelândia saudável (A e C) e após indução da CMD por doxorubicina e tratados com LASSBio 294 (B e D). Em A e B, corações medidos em eixo curto. Em C e D, corações medidos em eixo longo. Em B e D, nota-se cardiomegalia, caracterizando CMD. ....81
- FIGURA 12: Fotomicrografias de tecido cardíaco de coelhos Nova Zelândia saudável (A) e submetidos a indução da CMD por doxorubicina e tratado com pimobendana (0,3mg/Kg) (B, C e D). Em B, C e D: Nota-se evidência da fibrose intersticial pela coloração do Tricrômico de Masson. Objetiva: 20x (A) e 40x (B,C e D).....83

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

TABELA 1 - Médias de amplitude e duração das ondas P, complexo QRS, duração do intervalo P-R e Q-T e frequência cardíaca de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos, submetidos a indução da cardiomiopatia dilatada (CMD) por doxorubicina e avaliados quinzenalmente (T0, T15, T30,T45, CMD). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016).	28
TABELA 2: Médias obtidas a partir da avaliação das imagens em modo-B e modo-M de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos, submetidos a tratamento com doxorubicina para indução de cardiomiopatia dilatada (CMD) e avaliados quinzenalmente (T0,T15, T30,T45, CMD). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016).	29
TABELA 3: Médias dos valores ecodopplercardiográficos obtidos a partir da avaliação dos fluxos transvalvares de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos, submetidos a tratamento com doxorubicina para indução de cardiomiopatia dilatada (CMD) e avaliados quinzenalmente (T0,T15, T30,T45, CMD). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016).	30
TABELA 4: Médias dos valores ecodopplercardiográficos obtidos a partir da avaliação Doppler tecidual da parede livre do VE em corte transversal e na altura do anel mitral em corte apical (L) de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos, submetidos a tratamento com doxorubicina para indução de cardiomiopatia dilatada (CMD), durante 45 dias e avaliados quinzenalmente (T0,T15, T30,T45, CMD). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016).	31
TABELA 5: Médias dos valores de pressão arterial mensurados pelos métodos Doppler e oscilométrico de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos e submetidos a tratamento com doxorubicina para indução de cardiomiopatia dilatada (CMD) e avaliados quinzenalmente (T0, T15, T30, T45, CMD). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016).	32
TABELA 6: Médias dos valores de VHS de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos e submetidos a tratamento com doxorubicina para indução de cardiomiopatia dilatada (CMD) e avaliados quinzenalmente (T0,T15, T30,T45, CMD). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016).	32
TABELA 7: Médias dos parâmetros hematológicos (eritrograma) de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos e submetidos a tratamento com doxorubicina para indução de cardiomiopatia dilatada (CMD) e avaliados quinzenalmente (T0,T15,T30,T45 e CMD). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016).	34
TABELA 8: Médias dos parâmetros hematológicos (leucograma) de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos e submetidos a tratamento com doxorubicina para indução de cardiomiopatia dilatada (CMD) e avaliados quinzenalmente (T0, T15, T30, T45, CMD). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016).	35
TABELA 9: Médias e erros padrão dos valores bioquímicos de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos e submetidos a tratamento com doxorubicina para indução de cardiomiopatia dilatada (CMD), durante 45 dias e avaliados quinzenalmente (T0, T15, T30, T45, CMD). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016).	35



### CAPÍTULO 3

TABELA 1 - Parâmetros farmacocinéticos após administração via oral de 2mg/kg do LASSBio-294 em coelhos Nova Zelândia hípidos (média, n = 2). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016). .....	59
TABELA 2 - Valores das médias de amplitudes e duração das ondas P, complexo QRS, e intervalo dos segmentos P-R e Q-T e frequência cardíaca de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos, submetidos a tratamento com LASSBio 294 (A) ou controle positivo pimobendana (B), após o período de indução da cardiomiopatia dilatada (CMD) com doxorubicina e submetidos a avaliações semanais (S0, S1, S2, S3, S4). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016). .....	62
TABELA 3 - Valores dos parâmetros ecodopplercardiográficos, em modo M de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos, submetidos a tratamento com LASSBio 294 (A) ou controle positivo pimobendana (B), após o período de indução da cardiomiopatia dilatada (CMD) com doxorubicina e submetidos a avaliações semanais (S0, S1, S2, S3, S4). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016). .....	63
TABELA 4 - Valores das médias dos parâmetros ecodopplercardiográficos, em modo Doppler de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos, submetidos a tratamento com LASSBio 294 (A) ou controle positivo pimobendana (B), após o período de indução da cardiomiopatia dilatada (CMD) com doxorubicina e submetidos a avaliações semanais (S0, S1, S2, S3, S4). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016). .....	66
TABELA 5 - Valores das médias dos parâmetros ecodopplercardiográficos, em modo Doppler tecidual de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos, submetidos a tratamento com LASSBio 294 (A) ou controle positivo pimobendana (B), após o período de indução da cardiomiopatia dilatada (CMD) com doxorubicina e submetidos a avaliações semanais (S0, S1, S2, S3, S4). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016). .....	70
TABELA 6 - Valores das médias de pressão arterial aferida por método Doppler (PAS Doppler) e oscilométrico (PS, PD e PAM) em coelhos Nova Zelândia, machos, adultos, submetidos a tratamento com LASSBio 294 (A) ou controle positivo pimobendana (B), após o período de indução da cardiomiopatia dilatada (CMD) com doxorubicina e submetidos a avaliações semanais (S0, S1, S2, S3, S4). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016). .....	71
TABELA 7 - Valores das médias do VHS de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos, submetidos a tratamento com LASSBio 294 (A) ou controle positivo pimobendana (B), após o período de indução da cardiomiopatia dilatada (CMD) com doxorubicina e submetidos a avaliações semanais (S0, S1, S2, S3, S4). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016). .....	72
TABELA 8 - Valores das médias dos parâmetros hematológicos (eritrograma) de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos, submetidos a tratamento com LASSBio 294 (A) ou controle positivo pimobendana (B), após o período de indução da cardiomiopatia dilatada (CMD) com doxorubicina e submetidos a avaliações semanais (S0, S1, S2, S3, S4). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016). .....	74
TABELA 9 - Valores das médias dos parâmetros hematológicos (leucograma) de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos, submetidos a tratamento com LASSBio 294 (A) ou controle positivo pimobendana (B), após o período de indução da	

cardiomiopatia dilatada (CMD) com doxorubicina e submetidos a avaliações semanais (S0, S1, S2, S3, S4). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016). .....	75
TABELA 10 – Valores das médias da avaliação bioquímica sérica das enzimas ALT, AST, ALP, LDH, CK e CK <sub>MB</sub> e das concentrações de albumina, proteína plasmática, uréia, creatinina, fósforo, potássio e cálcio de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos, submetidos a tratamento com LASSBio 294 (A) ou controle positivo pimobendana (B), após o período de indução da cardiomiopatia dilatada (CMD) com doxorubicina e submetidos a avaliações semanais (S0, S1, S2, S3, S4). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016). .....	76
TABELA 11 - Valores das médias do peso do coração, peso corpóreo, relação peso corpóreo/coração e medidas do coração em eixo longo e curto de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos, submetidos a tratamento com LASSBio 294 (A) e controle positivo pimobendana (B) após o período de indução da cardiomiopatia dilatada (CMD) com doxorubicina e grupo de animais saudáveis (C). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016). .....	79
TABELA 12 - Valores das médias dos escores das variáveis histopatológicas de coelhos Nova Zelândia machos, adultos, submetidos a tratamento com LASSBio 294 (A) ou controle positivo, pimobendana (B), após o período de indução da cardiomiopatia dilatada (CMD) com doxorubicina. EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016). .....	80

## LISTA DE ABREVIATURAS

A'	Velocidade diastólica tardia
AE	Diâmetro do átrio esquerdo
AE/Ao	Relação átrio esquerdo aorta
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ANP	Peptídeo natriurético atrial
Ao	Diâmetro da aorta
AUC	Área sob a curva concentração plasmática-tempo
BNP	Peptídeo natriurético tipo-B
Ca <sup>+2</sup>	Íons cálcio
CF	Doppler de fluxo em cores
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
C <sub>I/F</sub>	Taxa de depuração
CK	Creatina quinase
CK <sub>MB</sub>	Creatina quinase fração do miocárdio
C <sub>max</sub>	Concentração plasmática máxima
CMAVD	Cardiomiopatia arritmogênica do ventrículo direito
CMD	Cardiomiopatia dilatada
CMH	Cardiomiopatia Hipertrófica
CMR	Cardiomiopatia restritiva
CVP	Complexo ventricular prematuro
CW	Doppler contínuo
DC	Débito cardíaco
DIVE s/d	Diâmetro interno do ventrículo esquerdo em sístole e diástole
DMV	Doença mixomatosa valvular
DT	Doppler tecidual
E'	Velocidade diastólica precose
E'/A'	Relação entres as velocidade diastólicas precose e tardia
E/A <sub>m</sub>	Relação entre as ondas E/A mitral
E/A <sub>t</sub>	Relação entre as ondas E/A tricúspide
ECG	Eletrocardiograma
EDTA	Etilenodiaminotetracetato
E/E'	Relação entre a onda E do fluxo mitral e a velocidade diastólica precose
EVZ	Escola de Veterinária e Zootecnia
FC	Frequência cardíaca
FE	Fração de ejeção
FS	Fração de encurtamento
GMP	Monofosfato de guanosina
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HE	Hematoxilina eosina
i-ECA	Inibidores da enzima conversora de angiotensina
IC	Insuficiência cardíaca
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva
LABIOCON	Laboratório de Bioconversão
LASSBio	Laboratório de Avaliação de Substâncias Bioativas
LDH	Lactato desidrogenase

MRT	Monitoramento de Múltiplas Reações
NAH	<i>N</i> -acelidrazônico
NE	Norepinefrina plasmática
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PDE	Fosfodiesterase
PW	Doppler pulsado
RAS	Peptídeos do sistema renina-angiotensina
SERCA	Retículo sarcoplasmático-cálcio ATPase
SIV s/d	Septo interventricular em sístole e diástole
TEB	Tecnologia Eletrônica Brasileira
$T_{1/2}$	Meia vida plasmática
$T_{\max}$	Tempo para $C_{\max}$
TRIV	Tempo de relaxamento isovolumétrico
UFG	Universidade Federal de Goiás
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
$V_{Z/F}$	Volume aparente de distribuição
$V_{\max_a}$	Velociade máxima do fluxo aórtico
$V_{\max_{Am}}$	Velocidade máxima da onda A do fluxo mitral
$V_{\max_{At}}$	Velocidade máxima da onda A do fluxo tricúspide
$V_{\max_{Em}}$	Velocidade máxima da onda E do fluxo mitral
$V_{\max_{Et}}$	Velocidade máxima da onda E do fluxo tricúspide
$V_{\max_p}$	Velociade máxima do fluxo pulmonar
VCM	Volume corpuscular médio
VE	Ventrículo esquerdo
VHS	<i>Vertebral heart size</i>
VS	Volume sistólico

## RESUMO

A cardiomiopatia dilatada (CMD) é uma enfermidade do músculo cardíaco que culmina em dilatação do ventrículo esquerdo, e/ou direito, e disfunção contrátil do miocárdio, sendo a fase clínica da doença caracterizada por sinais de insuficiência cardíaca congestiva (ICC), com ou sem a presença de arritmias. O tratamento envolve a utilização de fármacos que visem diminuir os sinais de ICC e as arritmias, sendo os diuréticos, inotrópicos positivos, vasodilatadores e antiarrítmicos os mais utilizados. Recentemente foi desenvolvido um novo candidato a fármaco (LASSBio 294) capaz de promover os efeitos vasodilatador e inotrópico positivos combinados, tendo sido testado em estudo pré-clínico em cães saudáveis da raça Beagle, com resultados promissores. Propôs-se neste estudo verificar a ação do protótipo a fármaco LASSBio 294, na dose de 2mg/kg, sobre os parâmetros cardiovasculares de coelhos com CMD experimentalmente induzida por doxorubicina, utilizando como controle positivo o tratamento com a pimobendana, na dose de 0,3mg/Kg. A CMD foi induzida por meio da administração endovenosa de 1mg/Kg de doxorubicina, na concentração de 2mg/mL, duas vezes na semana, por três semanas e depois semanalmente até que alcançada fração de encurtamento igual ou inferior a 25%. Como métodos de avaliação da ação do LASSBio 294 sobre o sistema cardiovascular de coelhos e monitoramento da indução da CMD, foram realizados os seguintes exames: eletrocardiografia, ecodopplercardiografia, mensuração da pressão arterial, radiografia torácica, dosagem de biomarcadores de lesão cardíaca, de função renal e hepática e avaliação hematológica. Ao final do protocolo de indução os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos, A (LASSBio 294) e B (pimobendana), e foram submetidos a tratamento durante trinta dias, duas vezes ao dia. Ao final do estudo foi possível concluir que o modelo de CMD induzida por doxorubicina é um bom modelo para estudo da doença e suas consequências, induzindo disfunção sistólica e diastólica do miocárdio, com dilatação do ventrículo esquerdo. Porém, o tempo para indução da CMD é inexato e a ocorrência de toxicidade multissistêmica, como a mielossupressão e nefrotoxicidade, contribui para a elevada taxa de mortalidade dos animais (35%). Ainda, conclui-se que o LASSBio 294 é eficiente em incrementar a função sistólica, melhorar a função diastólica, sem alterar a pressão arterial dos coelhos, não apresentando efeito pró arritmogênico ou tóxico, e reduzindo a concentração sérica de creatinina dos animais, porém não impede a evolução do quadro congestivo.

Palavras-chave: Insuficiência cardíaca, leporino, inodilatador, vasodilatador, cardiotônico

## ABSTRACT

Dilated cardiomyopathy (DCM) is a disease of the heart muscle that culminates in dilatation of the left ventricle, or both, and myocardial contractile dysfunction. The clinical phase of the disease is characterized by congestive heart failure signs (CHF), with or without arrhythmias. The treatment involves the use of drugs aimed at reducing the signs of CHF and arrhythmias, with diuretics, positive inotropic, vasodilator and antiarrhythmic. A new drug candidate (LASSBio 294), capable of promoting combined positive inotropic and vasodilating effects, has recently been developed, and have been tested in pre-clinical study in healthy Beagle dogs with promising results. Therefore, this study proposed to verify the action of the drug prototype LASSBio 294, at a dose of 2mg/Kg on cardiovascular parameters of rabbits with DCM experimentally induced by doxorubicin, using as positive control the pimobendan at a dose of 0.3mg/kg. The DCM was induced by intravenous administration of 1 mg/kg of doxorubicin, at a concentration of 2mg/ml, twice a week, for three weeks, and then weekly until it reached fractional shortening less or equal to 25%. As methods of evaluating the LASSBio 294 action on the cardiovascular system of rabbits and monitor the induction of DMC, the following tests were performed: electrocardiography, echodopplercardiography, measurement of blood pressure, chest radiograph, dosage of cardiac lesions, and kidney and liver function biomarkers and hematologic evaluation. At the end of the induction protocol the animals were randomly divided into two groups A (LASSBio 294) and B (pimobendan) and underwent treatment for 30 days, twice a day. At the end of the study it was concluded that the DCM model induced by doxorubicin is a good model to study the disease and its consequences, leading to systolic and diastolic dysfunction with dilatation of the left ventricle. However the time for induction of DCM is inaccurate and the occurrence of multisystemic toxicity, such as nephrotoxicity and myelosuppression, contributes to high mortality rate in this model (35%). It can be concluded that LASSBio 294 is effective in increasing systolic function, improving diastolic function, without altering rabbits blood pressure, has no pro-arrhythmogenic or toxic effect, and reduced the serum creatinine concentration of the animals, but it does not prevent the evolution of the congestive condition.

Keywords: heart failure, leporine, inodilator, vasodilator, cardiotonic

## **CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS**

### **1. CARDIOMIOPATIA DILATADA**

Cardiomiopatias são definidas como enfermidades estruturais e/ou funcionais do músculo cardíaco, as quais podem levar ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca. Essas enfermidades podem ser primárias dos cardiomiócitos ou podem ocorrer secundariamente a outras doenças sistêmicas, insultos tóxicos ou isquêmicos<sup>1</sup>. Em outra definição, são descritas como enfermidades dos cardiomiócitos associadas a disfunção mecânica e/ou elétrica destes, que podem ou não cursar com hipertrofia concêntrica ou excêntrica das câmaras ventriculares, devido a diversas causas, incluindo fatores genéticos<sup>2</sup>.

Em 1995, a Organização Mundial de Saúde (OMS) classificou as cardiomiopatias em quatro categorias, de acordo com a fisiopatogenia ou etiologia das mesmas, em: cardiomiopatia dilatada (CMD), cardiomiopatia hipertrófica (CMH), cardiomiopatia restritiva (CMR) e cardiomiopatia arritmogênica do ventrículo direito (CMAVD)<sup>3</sup>.

Onze anos após a classificação da OMS, a Sociedade Americana de Cardiologia divulgou uma nova classificação, dividindo as cardiomiopatias em duas grandes subcategorias, baseando-se no envolvimento primário dos órgãos. Sendo assim, as cardiomiopatias foram classificadas em primárias, podendo ser de etiologia genética, não genética ou adquirida, porém predominantemente restrita ao músculo cardíaco e secundárias, quando a lesão miocárdica ocorre em conjunto com desordens multissistêmicas<sup>2</sup>.

A cardiomiopatia dilatada é a apresentação mais comum das doenças que comprometem o músculo cardíaco, sendo responsável por aproximadamente 60% dos casos em seres humanos e é o estágio final comum de muitas desordens cardiovasculares. Porém, em muitos casos de CMD, uma causa genética ou sistêmica não é encontrada como causadora da disfunção sistólica e dilatação ventricular e, por isso, existe também o termo cardiomiopatia dilatada idiopática<sup>1</sup>. Essa enfermidade é apontada como sendo a causa mais comum de transplante cardíaco, tanto em adultos como em crianças<sup>4</sup>.

É definida como uma doença do miocárdio, que causa dilatação predominante do ventrículo esquerdo e consequente disfunção sistólica deste, porém nos estágios iniciais, o comprometimento sistólico é mínimo. Entre os seres humanos, os insultos isquêmicos são responsáveis por 50% dos casos de CMD. Outras causas incluem insultos tóxicos, dentre esses os agentes quimioterápicos, alterações metabólicas, causas imunológicas, quadros

hipertensivos, doenças infiltrativas e doenças valvares<sup>5</sup>. Porém, outros autores consideram que cardiomiopatia dilatada seja uma enfermidade que cause dilatação ventricular, com disfunção sistólica, excluindo aquelas causadas por insultos isquêmicos ou como consequência de doença valvular<sup>6</sup>.

O avanço dos estudos genéticos tem contribuído para o maior diagnóstico das CMD de origem familiar<sup>5</sup>. Foi demonstrado que 20-30% dos casos descritos como idiopáticos possuem origem familiar, sendo encontradas alterações de tamanho e função ventricular nos parentes de primeiro grau do paciente portador, usualmente por meio de ecodopplercardiografia<sup>7</sup>. Por esse motivo, recomenda-se que durante o levantamento do histórico familiar do paciente sejam obtidas informações da terceira até quarta geração do mesmo, pesquisando-se qualquer evidência de cardiomiopatia, distrofia muscular e síndromes sistêmicas que levam à cardiomiopatia<sup>6</sup>.

Apesar dos avanços alcançados, ainda há muito o que pesquisar sobre a CMD de origem familiar, visto que somente 40% das causas genéticas são reconhecidas, sendo reportado o envolvimento de um pouco mais de trinta genes, os quais afetam a função de algumas proteínas, que compõem a matriz extracelular e o citoesqueleto. No entanto, apesar de serem reconhecidos distintos fatores genéticos, a apresentação fenotípica final é mesma, resultando em insuficiência cardíaca, esta associada a morbidade e mortalidade<sup>7</sup>.

A cardiomiopatia dilatada dos caninos é fenotipicamente semelhante à dos seres humanos e é apontada como a segunda doença cardíaca mais frequente nessa espécie, ficando atrás somente das doenças valvulares<sup>8</sup>. Entre os felinos é uma condição rara e geralmente é associada à deficiência de taurina, sendo pouco diagnosticada atualmente devido à suplementação dessa nas dietas comerciais<sup>9</sup>.

Assim como nos seres humanos, nos caninos existem evidências que apontam as alterações genéticas como causadoras das cardiomiopatias dilatadas. Isso porque é uma doença prevalente entre as raças grandes e gigantes, sugerindo, portanto, que seja uma doença familiar. Dentre as raças mais acometidas destacam-se os Dobermans, Terra Nova, Dogue Alemão e Irish Wolfhound. Os Cockers e Bulldogs também podem ser acometidos, apesar do porte médio<sup>8,10</sup>. Um estudo, feito com 775 Dobermans na Europa, detectou a doença em 58,2% dos animais, sendo os cães acima de cinco anos os mais acometidos<sup>10</sup>.

Essa enfermidade apresenta alta taxa de morbidade e mortalidade, tanto entre os seres humanos como entre os caninos<sup>8</sup>, sendo a taxa de sobrevida dependente dos sinais clínicos apresentados pelo paciente no momento do diagnóstico, ou seja, dependente da presença ou não da insuficiência cardíaca. Entre os cães, a CMD é a maior causa de morte de



origem cardiogênica. Em ambas as espécies é uma doença fatal, a não ser que a etiologia seja descoberta e passível de tratamento<sup>11</sup>.

Na espécie canina, são reconhecidas duas apresentações histológicas da CMD: fibras atenuadas e infiltração gordurosa. Porém, a apresentação macroscópica dessas é semelhante, resultando em dilatação de uma e/ou das quatro câmaras cardíacas, com predomínio das câmaras esquerdas. A hipertrofia miocárdia excêntrica, ao contrário de dilatação verdadeira, é evidenciada pelo aumento da razão peso do coração:peso corpóreo, acompanhada de diminuição da razão da espessura da parede do ventrículo esquerdo:diâmetro da câmara. O tipo “fibras atenuadas”, consiste em cardiomiócitos mais finos que o normal e com aparência ondulada, com separação desses por conteúdo edematoso, não infeccioso, notando-se presença acentuada de fibrose<sup>12</sup>.

O tipo “infiltração gordurosa” é semelhante ao reportado na CMAVD dos seres humanos. No entanto, já foi reportada em cães Dobermans portadores de CMD, assim como em boxers com CMAVD. Nesse tipo encontra-se miocitólise, degeneração da fibra muscular, vacuolização e atrofia dos miócitos, com fibrose e infiltração gordurosa extensas<sup>12</sup>.

Clinicamente, a CMD pode ser dividida em dois estágios: cardiomiopatia dilatada oculta ou pré-clínica e cardiomiopatia dilatada evidente ou clínica. A fase pré-clínica ou oculta é caracterizada pela presença de alterações elétricas, detectadas ao exame eletrocardiográfico, e/ou morfológicas, detectadas ao exame ecodopplercardiográfico, no entanto o paciente ainda não apresenta sinais de insuficiência cardíaca. Como são alterações passíveis de serem detectadas por meio de exames complementares, o termo “oculta” deve ser evitado. A anormalidade elétrica refere-se à presença de complexos ventriculares prematuros e a morfológica à presença de aumento da câmara ventricular, em sístole e/ou diástole, podendo essas alterações coexistirem ou não<sup>11,12</sup>.

A fase evidente ou clínica da CMD refere-se à presença de sinais clínicos de insuficiência cardíaca congestiva (ICC) ou morte súbita. Os sinais clínicos de ICC incluem dispneia, tosse, depressão, intolerância ao exercício, inapetência, síncope, perda de peso, distensão abdominal e polidipsia<sup>12</sup>. Porém, quando o paciente não é um cão de trabalho, o sinal inicial de intolerância ao exercício pode não ser identificado, sendo somente relatada dispneia quando há presença de edema pulmonar<sup>11</sup>.

Ao exame clínico é possível encontrar dispneia ou taquipneia, crepitações ou estertores pulmonares, taquicardia, arritmias e, em alguns cães, presença de sopro sistólico de intensidade baixa ou moderada, grau I-III/VI, em focos mitral e/ou tricúspide. Além disso, pode-se auscultar um ritmo de galope ou desdobramento de terceira bulha. À inspeção física

encontra-se pulso femoral fraco, distensão de veia jugular, sendo visibilizada pulsação dessa, mucosas pálidas, e sinais de hipotrofia muscular, compatíveis com estado de caquexia cardíaca<sup>13</sup>. Os sinais clínicos variam entre os pacientes e entre raças, sendo reportados sinais mais severos entre os Dobermans<sup>11</sup>.

Os sinais reportados anteriormente são apresentações clínicas comuns às distintas causas de cardiomiopatia dilatada, visto que, invariavelmente, a doença irá cursar com remodelamento do miocárdio, com consequente comprometimento estrutural e funcional dos cardiomiócitos e da matriz extracelular. O comprometimento sistólico resultará em ativação neuro-hormonal, que irá proporcionar a retenção de sódio e água, o que conjuntamente com a disfunção sistólica e diastólica ventricular, levará a ICC. A alta pressão de enchimento pode comprometer a perfusão coronariana, que associada à grande pressão sobre as paredes ventriculares, frequência cardíaca elevada e fibrose miocárdica, criam o substrato para as arritmias. O sopro mitral e/ou tricúspide é outro sinal presente em consequência ao remodelamento, o qual irá alterar a geometria na altura dos aparatos valvares, à medida que os ventrículos ficam mais arredondados, afastando as cúspides e, consequentemente, tornando-as insuficientes<sup>13</sup>.

O diagnóstico dos pacientes portadores de CMD é alcançado por meio da anamnese, sinais clínicos reportados e achados em exames complementares, sendo os mais utilizados o eletrocardiograma e a ecodopplercardiografia. Os pacientes que se apresentam na fase pré-clínica não irão apresentar sinais clínicos, mas apresentarão alterações eletrocardiográficas e/ou ecocardiográficas, no entanto, sendo o eletrocardiograma (ECG) dinâmico, Holter, o mais recomendado nesses casos<sup>13</sup>. No entanto, o achado de um complexo ventricular prematuro (CVP) no ECG ambulatorial é indicativo para que se faça uma investigação mais detalhada do paciente, como demonstrado no estudo de Wess et al.<sup>14</sup>.

O eletrocardiograma ambulatorial pode fornecer informações quanto à sobrecarga das câmaras, podendo ser encontrado aumento de duração de complexos QRS, sugestivo de sobrecarga ventricular ou distúrbio de condução e aumento de amplitude e/ou duração de ondas P, sugestivo de sobrecarga atrial direita e esquerda, respectivamente. As arritmias mais frequentes são as supraventriculares ou atriais, que são associadas ao aumento dos átrios e alta frequência cardíaca, porém em Boxers e Dobermans os complexos ventriculares prematuros (CVP) e taquicardias ventriculares são mais frequentes<sup>12,13</sup>.

Em um levantamento realizado em uma população de 412 Dobermans, sendo 92 desses diagnosticados com CMD, foi observado que em 37% dos animais a presença de CVP no Holter foi a única alteração observada, em 29,3% foram observadas alterações

ecocardiográficas e presença de CVP e somente 13% apresentavam alterações ecocardiográficas sem eventos arrítmicos, os 20,7% restantes apresentavam-se na fase clínica da enfermidade<sup>10</sup>.

Os achados ecocardiográficos incluem dilatação ventricular, com o ventrículo assumindo uma morfologia mais esférica, e disfunção sistólica, caracterizada pela diminuição das frações de encurtamento ( $FS < 20-25\%$ ) e ejeção ( $FE < 40-50\%$ ), demonstrando o déficit contrátil do miocárdio e sobrecarga volumétrica. Pode-se observar regurgitação mitral e/ou tricúspide em alguns casos. Em situações de ICC direita, efusão pericárdica pode estar presente e passível de identificação por meio do ecocardiograma<sup>12,15</sup>.

Além de serem ferramentas auxiliares no diagnóstico de CMD, o ECG e o ecocardiograma também podem fornecer informações prognósticas, pois já está provado que quanto maior o coração e, em consequência, a sobrecarga de volume, e quanto mais frequentes os episódios de taquicardia ventricular, maior a chance do paciente apresentar morte súbita<sup>16</sup>.

A radiografia torácica é outra ferramenta auxiliar no diagnóstico de CMD. Essa técnica permite inferir sobre o tamanho do coração e também avaliar os campos pulmonares. Pacientes em ICC esquerda, podem apresentar quadros de edema pulmonar e a radiografia torácica é utilizada para o diagnóstico e acompanhamento do tratamento instituído<sup>13</sup>. A presença de edema pulmonar foi negativamente relacionada à sobrevivência, em um estudo envolvendo várias raças de cães portadores de CMD<sup>17</sup>.

Os biomarcadores cardíacos também foram adicionados aos métodos auxiliares de diagnóstico da CMD e podem ser divididos em dois tipos. O primeiro grupo são os biomarcadores de injúria e necrose do miocárdio e incluem as enzimas cardíacas creatina quinase (CK), aspartato aminotransferase (AST), lactato desidrogenase (LDH) e proteínas estruturais do miocárdio, as troponinas. O segundo grupo de biomarcadores são os utilizados para verificar o grau de disfunção cardíaca e são representados pelos neuro-hormônios. Os mais comumente utilizados para verificar sinais de ativação neuro-hormonais são norepinefrina plasmática (NE), o peptídeo natriurético atrial (ANP), o peptídeo natriurético tipo-B (BNP) e os peptídeos do sistema renina-angiotensina (RAS), quais sejam, vasopressina, aldosterona e endotelina plasmática<sup>18</sup>.

A maior aplicação dos biomarcadores é para diferenciar pacientes em estresse respiratório cardiogênico, daqueles não cardiogênicos, visto que em muitas situações a manipulação desses pacientes para realização de exames radiográficos e ecocardiográficos pode representar risco de morte. Para esse fim o NT-proBNP é o mais sensível, por ser um

bom marcador de função cardíaca, já que é um peptídeo natriurético liberado frente ao aumento de pressão nas paredes ventriculares e atriais, situação observada em doenças cardíacas primárias. Em casos de cardiomiopatias, o NT-proBNP, demonstra ser um bom marcador de doença oculta na cardiomiopatia dilatada dos Dobermans. Já as troponinas são mais eficientes em detectar quadros de miocardite e lesão miocárdica aguda porém, por serem marcadores de lesão aos cardiomiócitos, podem encontrar-se elevadas em doenças extra-cardíacas que provoquem dano ao tecido cardíaco<sup>19</sup>.

O tratamento da CMD visa a manutenção da qualidade de vida do paciente, combatendo os sintomas de ICC e prevenindo a progressão da doença<sup>15</sup>. Tanto em pacientes humanos como em caninos, mesmo aqueles assintomáticos, o uso do neuromoduladores como os inibidores da enzima conversora de angiotensina (i-ECA) e beta bloqueadores é aconselhável para prevenir a progressão da doença, diminuindo o ritmo do remodelamento ventricular. Os diuréticos são incorporados ao tratamento para reduzir o edema de extremidades e congestão pulmonar, naqueles pacientes sintomáticos<sup>6,20</sup>.

Em humanos com grande comprometimento da fração de ejeção, ou seja, com disfunção sistólica importante, é aconselhável a realização de terapia de ressincronização cardíaca, visto que a utilização de fármacos inotrópicos positivos como a dopamina e dobutamina não é aconselhável por tempo prolongado, visto que aumenta o estresse mecânico. A terapia de ressincronização irá melhorar o sincronismo mecânico do ventrículo esquerdo, aumentando o tempo de enchimento ventricular, diminuindo a regurgitação mitral e reduzindo a discinesia septal, frequentemente observada em adultos. Em casos mais severos, o transplante cardíaco é a única opção, porém a lista de espera por órgãos é grande e os pacientes ficam em suporte ventilatório e mecânico, com redução significativa da qualidade de vida<sup>6,15</sup>.

Em medicina veterinária a terapia de escolha para tratamento de cães com CMD é a pimobendana. Esse fármaco apresenta propriedades inotrópicas positivas e vasodilatadoras combinadas, sendo denominado de inodilatador, porém seu uso só é licenciado no Japão, Canadá, Estados Unidos, Austrália e alguns países de Europa<sup>21</sup>. A propriedade inodilatadora da pimobendana é alcançada por meio de dois mecanismos, quais sejam, sensibilização ao cálcio e inibição da fosfodiesterase tipo 3 (PDE 3), ambas resultam em aumento da contratilidade miocárdica e a inibição da PDE 3 também induz vasodilatação<sup>22,23</sup>.

O uso da digoxina, como inotrópico positivo, foi substituído pela pimobendana em cães. Isso porque a digoxina possui uma janela terapêutica pequena, sendo comum a ocorrência de efeitos adversos como alterações gastrointestinais, incluindo inapetência,

vômito e diarreia e eventos arrítmicos como bradiarritmias e taquiarritmias. Além disso, apresenta efeito inotrópico positivo fraco, mas seu efeito sobre o nó atrioventricular é interessante para tratamento da fibrilação atrial, arritmia comum entre os pacientes portadores de CMD<sup>24</sup>.

A instituição da terapia antiarrítmica dependerá do número e da complexidade dos CVPs observados no Holter e da presença de sinais clínicos associados à arritmia. Porém, ainda não se sabe quais os protocolos mais eficazes e quando se deve instituir o tratamento. Dentre os fármacos mais utilizados destacam-se o sotalol, a amiodarona, e a combinação de mexiletine e atenolol ou procainamida com atenolol<sup>20</sup>. Um estudo considerando os fatores de risco associados à morte súbita em Dobermans, demonstrou que aqueles que recebiam terapia antiarrítmica apresentavam mais chances de morte súbita, no entanto isso significa que aqueles que apresentam arritmias malignas estão no grupo de risco e não que a terapêutica aumenta esse risco, como relatam estudos com humanos<sup>11,16</sup>.

## **2. MODELOS EXPERIMENTAIS DE CARDIOMIOPATIA DILATADA**

A busca por novos fármacos para tratamento de pacientes com CMD e outras cardiopatias que levem a ICC baseia-se principalmente naqueles capazes de prevenir os quadros congestivos ou até mesmo reverter os danos estruturais e/ou funcionais do miocárdio. Para que esse objetivo seja alcançado, faz-se necessário o teste desses novos fármacos, sendo uma das fases desse processo a avaliação da ação desses em modelos animais, portadores de cardiopatias<sup>25</sup>.

Existem inúmeras vantagens na utilização de modelos animais para investigação da ação de novos fármacos, dentre elas: disponibilidade de controles saudáveis, ausência de fatores como diferença de idade, peso ou até mesmo sexo dos sujeitos e também a ausência de enfermidades ou terapias concomitantes. Dito isso, o modelo ideal deveria apresentar as alterações cardíacas estruturais, hemodinâmicas e neuro-hormonais mais próximas possíveis daquelas apresentadas pelos pacientes portadores da cardiopatia estudada<sup>26</sup>.

Os modelos animais utilizados para estudo da cardiomiopatia dilatada podem ser de grande ou de pequeno porte. Idealmente, o modelo deve apresentar dilatação esférica do ventrículo esquerdo, caracterizada por aumento desta câmara ventricular em sístole e diástole, com ou sem diminuição da espessura da parede, redução da relação massa/volume ventricular e funções sistólica e diastólica reduzidas. Dentre os pequenos animais, os roedores se destacam por serem relativamente de baixo custo e de fácil manipulação, o que torna possível

a utilização de uma grande amostragem de sujeitos, aumentando o poder estatístico do estudo<sup>25</sup>.

Porém, existem diferenças marcantes entre o coração humano e o de roedores como, por exemplo, a frequência cardíaca ser cinco vezes mais alta nos ratos, existindo uma relação inversa entre força e frequência. Além disso, existem diferenças estruturais, funcionais e moleculares entre os corações de pequenos e grandes mamíferos, o que torna obrigatório que todo novo fármaco seja testado também em uma espécie não roedora, antes dos testes preliminares em humanos serem aprovados. Dentre os modelos roedores para cardiomiopatia dilatada mais utilizados destacam-se os naturalmente portadores da doença, os geneticamente modificados e os com CMD induzida após injúria isquêmica ao miocárdio<sup>25,26</sup>.

Dentre os mamíferos não roedores utilizados como modelo de CMD de porte médio a grande destacam-se os coelhos, cães e ovinos e suínos. Esses modelos são vantajosos devido seu peso corpóreo permitir a realização de procedimentos não invasivos para avaliação hemodinâmica. A CMD pode ser induzida nesses animais por meio de infarto miocárdico, micro embolização coronária, taquicardia induzida por marcapasso ou por catecolaminas e por injúria tóxica. Os suínos e ovinos são os mais utilizados como modelos isquêmicos por possuírem circulação coronariana semelhante à dos seres humanos, ao contrário dos cães que possuem circulação coronariana colateral bem desenvolvida e apresentam alta variabilidade na área de infarto, não sendo portanto um modelo previsível<sup>25</sup>.

Os modelos de CMD induzida por taquicardia são os mais utilizados em cães. Esses modelos apresentam grande semelhança mecânica, estrutural, neuro-humoral e funcional à CMD dos humanos e tem sido utilizados para estudos farmacológicos. Porém o modelo apresenta algumas limitações como ser reversível ao longo do tempo, em geral uma semana após o término do estímulo do marcapasso, não apresentar hipertrofia dos cardiomiócitos e fibrose. A taquicardia pode também ser induzida por fármacos como as catecolaminas, as quais induzem cardiomiopatia caracterizada por dilatação do VE, com disfunção sistólica, porém a taxa de mortalidade do modelo é muito alta<sup>25,27</sup>.

Os coelhos apresentam características que os tornam bons modelos de pesquisa em cardiologia, como por exemplo o peso corpóreo reduzido quando comparado com ovelhas, suínos e cães, o que torna sua acomodação e manipulação menos laboriosa. Apesar do coração dos leporinos não ser tão parecido com o humano, como o de cães e ovelhas, os custos associados à aquisição de coelhos e sua manutenção são reduzidos. Outrossim, a avaliação de função miocárdica dos coelhos é facilmente obtida por meio de exames de imagem, como o ecocardiograma, e também por meio do estudo da atividade elétrica do

coração, utilizando para isso o eletrocardiograma, sendo possível realizar os procedimentos em animais sem a necessidade de sedação<sup>28</sup>.

O modelo de CMD não isquêmica induzida por doxorubicina ou outras antraciclinas tem sido o mais utilizados em coelhos. Esse modelo induz a doença por meio de insulto tóxico aos cardiomiócitos com grande dilatação cardíaca, hipertrofia do VE e disfunção sistólica desse, de forma progressiva e irreversível, acompanhada de sinais de insuficiência cardíaca, como retenção de fluidos e ativação do sistema nervoso simpático e do sistema renina-angiotensina-aldosterona. Porém, as alterações histopatológicas não são as mesmas observadas em pacientes portadores de CMD de ocorrência natural, por se tratar de insulto tóxico com formação de radicais livres e peroxidação lipídica. Outras limitações incluem a variabilidade da disfunção ventricular entre os animais e outros efeitos colaterais como toxicidade gastrointestinal e à medula óssea<sup>25,27</sup>.

Existem vários modelos de CMD induzida por antraciclinas descritos na literatura. Dentre esses pode-se citar dois mais recentes: o proposto por Gava et al.<sup>29</sup> e por Talavera et al.<sup>30</sup>. O modelo de Gava et al.<sup>29</sup> propõe a indução de CMD por meio da administração de 1mg/kg de doxorubicina, duas vezes por semana, durante seis semanas tendo testado também a utilização de 2mg/kg, uma vez por semana, durante seis semanas, com observação de menor taxa de mortalidade no primeiro. Já Talavera et al.<sup>30</sup> compararam a utilização de doxorubicina na dose de 2mg/Kg, uma vez por semana, durante oito semanas com a utilização de daunurubicina na dose de 3mg/kg, uma vez por semana, durante dez semanas ou 4mg/kg, uma vez por semana, durante seis semanas e concluiu que o último apresentou menor taxa de mortalidade, com alta de taxa de desenvolvimento de CMD (92%) e ICC (61%) e baixa taxa de manifestações de toxicidade sistêmica.

### **3. CANDIDATO A FÁRMACO CARDIOTÔNICO LASSBio 294**

O tratamento da cardiomiopatia dilatada e outras enfermidades que tenham como via final a insuficiência cardíaca visa o controle dos sintomas, aumento da sobrevida, diminuição do tempo de hospitalização e, em contrapartida, a manutenção da qualidade de vida do paciente. Em humanos, os fármacos mais utilizados para tratamento dos pacientes em insuficiência cardíaca com disfunção sistólica é a associação de  $\beta$ -bloqueadores e inibidores da enzima conversora da angiotensina, com o uso ocasional de diuréticos para aqueles pacientes em quadros congestivos<sup>31</sup>.

Frente à necessidade de novos fármacos para tratamento da IC, o LASSBio 294, capaz de promover efeitos vasodilatadores e inotrópicos positivos combinados, foi desenvolvido pelo Laboratório de Avaliação de Substâncias Bioativas (LASSBio) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)<sup>32</sup>.

O LASSBio 294, derivado *N*-acilidrazônico (NAH), é um composto sintetizado a partir do safrol, extraído do óleo de sassafrás, encontrado em plantas como a canela-branca (*Ocotea pretiosa*)<sup>33</sup>. Com bioensaios, os resultados farmacológicos obtidos indicaram que LASSBio 294 foi capaz de induzir relaxamento, concentração-dependente, em anéis isolados e intactos de aorta de ratos, e estes resultados sugerem que o mecanismo de ação, quanto aos seus efeitos vasodilatadores, não é modulado pelo óxido nítrico (NO), nem pela cascata do ácido araquidônico ou por canais de K<sup>+</sup> podendo, efetivamente, estar relacionado com a inibição de PDEs. Isso porque o protótipo aumentou a concentração de monofosfato de guanosina (GMP) circulante, assim como observado com o candidato a fármaco zaprinast (que deu origem ao sildenafil), inibidor da PDE tipo 5<sup>34,35</sup>.

O efeito inotrópico positivo do LASSBio 294 também foi comprovado em bioensaios, em corações inteiros e frações de miocárdio de ratos. A partir de estimulação elétrica de tecido cardíaco de ratos, tratados com diferentes concentrações do LASSBio 294 e monitorados eletrocardiograficamente antes e após o tratamento, observou-se incremento na contração desses tecidos após a perfusão com o composto sem causar alterações de condução e nem arritmias. Esse estudo mostrou que, diferentemente de outros agentes inotrópicos positivos, a ação do LASSBio 294 parece não estar relacionada ao aumento da concentração do cálcio (Ca<sup>2+</sup>) intracelular ou a uma sensibilização dos miofilamentos ao Ca<sup>2+</sup>, mas sim ao aumento da mobilização desse eletrólitos no meio intracelular, ao atuar na captação/liberação do Ca<sup>2+</sup> contido no retículo sarcoplasmático, aumentando concentração de Ca<sup>2+</sup> nessa organela<sup>33</sup>.

A ação do LASSBio 294 foi também estudada em ratos com infarto miocárdico experimentalmente induzido. Nessas condições foi verificado que a dose de 2mg/Kg de LASSBio 294, administrada por via intraperitoneal, uma vez ao dia, durante quatro semanas, após a indução de infarto em ratos, foi capaz de reduzir o remodelamento induzido pelo quadro isquêmico, diminuindo o volume de colágeno depositado e os infiltrados, indicando ação no sistema imune dos animais tratados, supostamente regulando mediadores da inflamação. Adicionalmente, foi detectado aumento do lusitropismo cardíaco, com diminuição da pressão de enchimento do ventrículo esquerdo no grupo tratado, mecanismo associado à modulação da ação da proteína SERCA (Retículo sarcoplasmático-cálcio



ATPase), que aumenta a captação do  $\text{Ca}^{2+}$ , pelo retículo sarcoplasmático, induzindo ao relaxamento miocárdico e melhorando a função diastólica<sup>36</sup>.

Face ao atraente perfil farmacológico identificado para esse autêntico candidato a fármaco cardioativo (LASSBio 294) identificado em estudos *in vitro*<sup>33-35</sup> e estudos *in vivo*, ensaios pré-clínicos foram conduzidos<sup>37,38</sup> para identificar a ação desse sobre os parâmetros cardiovasculares de cães da raça Beagle e, adjunto, o perfil farmacocinético dos protótipos também foi determinado. Para tanto, os cães foram submetidos a três doses distintas do LASSBio 294, administradas em doses únicas de 2mg, 5mg e 10mg/Kg, via oral e a ação crônica da dose de 2mg/Kg, administrada uma vez ao dia, durante trinta dias, foi também avaliada<sup>37</sup>.

Foi observada diminuição da pressão arterial, com pico mínimo após quatro horas da administração, e incremento da função sistólica, com pico máximo após 24 horas da administração do protótipo, quando os animais receberam 2mg/kg, sem sinais de hipotensão ou efeitos adversos, demonstrando o potencial terapêutico do composto. Diferente dos bioensaios, não foi identificado um efeito dose dependente em cães, sendo os melhores resultados obtidos com a dose de 2mg/kg<sup>37</sup>.

Estudos *in vitro* e *in vivo* foram conduzidos para caracterizar os metabólitos do LASSBio 294, utilizando fungos e cães, e identificaram um derivado sulfóxido e um hidroxilado<sup>37,39,40</sup>. No entanto, outros pesquisadores identificaram o 3,4-dihidroxibenzoidrazida com sendo o único metabólito derivado do LASSBio 294 em bioensaios utilizando fígado de ratos. Ainda, identificaram que a isoforma CYP1A2 do citocromo P450 está envolvida no metabolismo do composto em roedores e humanos<sup>41</sup>. O estudo conduzido nos cães também avaliou a farmacodinâmica do protótipo e foi observado que o LASSBio 294 é rapidamente absorvido e eliminado, atingindo a concentração plasmática máxima em uma hora, decaindo rapidamente, não mantendo uma concentração plasmática por longo tempo. Nesse estudo sugeriu-se que fossem realizados ensaios com a administração do protótipo mais vezes ao longo de 24 horas, visando aumentar a concentração plasmática e, conseqüentemente, obter um efeito terapêutico mais evidente nos estudos *in vivo*<sup>37</sup>.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar os parâmetros cardiovasculares de coelhos com cardiomiopatia dilatada experimentalmente induzida pela doxorubicina e submetidos a ação do LASSBio 294, e comparar esses com os do grupo controle positivo, tratados com pimobendana.

### 4.2 Objetivos específicos

- Induzir experimentalmente a cardiomiopatia dilatada em coelhos a partir da administração endovenosa de 1mL/Kg de Doxorubicina, duas vezes por semana, durante três semanas e depois uma vez por semana até alcançada fração de encurtamento inferior a 25%;
- Avaliar a função cardíaca dos coelhos durante o período de indução da CMD por meio de exames ecocardiográficos, eletrocardiográficos, de pressão arterial e dosagem de biomarcadores de lesão cardíaca.
- Avaliar os coelhos com CMD tratados com LASSBio 294 por meio de exames ecocardiográficos, eletrocardiográficos, de pressão arterial e dosagem de biomarcadores de lesão cardíaca, antes e após a administração do LASSBio 294;
- Avaliar a toxicidade do composto ou da pimobendana à coelhos com CMD, por meio da dosagem da biomarcadores de lesão renal e hepática;
- Comparar os parâmetros cardiovasculares de coelhos com CMD tratados com LASSBio 294 com os do grupo controle positivo, tratados com pimobendana;
- Avaliar possíveis alterações clínicas provocadas pelo uso do protótipo a fármaco LASSBio 294;
- Identificar os metabólitos gerados por coelhos hígidos, em experimento piloto, após a administração do LASSBio 294 por meio de amostras de sangue, submetidas a cromatografia;

## REFERÊNCIAS

1. Sisakian, H. Cardiomyopathies: evolution of pathogeneses concepts and potencial for new therapies. *Word J Cariol* 2014 June; 6(6): 478-494.
2. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies. *Circulation*. 2006;113:1807-1816.
3. McKenna WJ. Reporto f the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation*. 1996;93:841-842.
4. Sanbe A. Cardiomyopathy: a disease of the myocardium. *Biol. Pharm. Bull.* 2013;36(1):18-22.
5. McNally EM, Golbus JR, Puckelwartz MJ. Genetic mutations and mechanisms in dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest*. 2013; 123(1):19-26.
6. Falk RH, Hershberger RE. The dilated, restrictive, and infiltrative cardiomyopathies. In: Braunwald E, Mann DL, Zipes DP, Libby P, Bonow RO, editors. *Braunwald's Heart disease: A textbook of cardiovascular medicine*. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2015. p.1551-73.
7. Hershberger RE, Hedges DJ, Morales A. Dilated cardiomyopathy: the complexity of a diverse genetic architecture. *Nat. Rev. Cardiol*. 2013; 10:531-547.
8. Simpson S, Edwards J, Ferguson-Mignan TFN, Cobb M, Mongan NP, Rutland C. Genetics of human and canine dilated cardiomyopathy. *Int J Genomics*. 2015: 13 pages.
9. Hambrook LE, Bennett PF. Effect of pimobendan on the clinical outcome and survival of cats with non-aurine responsive dilated cardiomyopathy. *J Feline Med Surg*. 2012; 14(4):233-239.
10. Wess G, Schulze A, Butz V, Simak J, Killich M, Keller LJM, Maeurer J, Hartmann K. Prevalence of dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers in various age groups. *J Vet Intern Med* 2010;24:533-538.
11. O'Grady MR, O'Sullivan ML. Dilated cardiomyopathy: an update. *Vet Clin Small Anim* 2004;34:1187-1207.
12. Dukes-McEwan J, Borgarelli M, Tidholm A, Vollmar AC, Haggstrom J. Proposed guidelines for the diagnosis of canine idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Vet Cardiol*. 2003;5(2):7-19.
13. Dukes-McEwan J. Canine dilated cardiomyopathy. In: Fuentes VL, Johnson LR, Dennis S, editors. *BSAVA Manual of canine and feline cardiorespiratory medicine*. 2. ed. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association; 2010. p. 200-2012.

14. Wess G, Schulze A, Geraghty N, Hartmann K. Ability of a 5-minute electrocardiography (ECG) for predicting arrhythmias in Doberman Pinschers with cardiomyopathy in comparison with a 24-hour ambulatory ECG. *J Vet Intern Med* 2010b; 24:367-371.
15. Jefferies JL, Towbin JA. Dilated cardiomyopathy. *Lancet* 2010; 375:752-762.
16. Kluser L, Holler PJ, Simak J, Tater G, Smets P, Rugamer D, Kuchenhoff H, Wess G. Predictors of sudden cardiac death in Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 2016; 30:722-732.
17. Martin MWS, Stafford Johnson MJ, Strehlau GJ. Canine dilated cardiomyopathy: a retrospective study of prognostic findings in 367 clinical cases. *Small Anim Pract* 2010; 51:428-436.
18. Petric AD, Tomsic K. Diagnostic methods of cardiomyopathy in dogs – old and new perspectives and methods. *Slovenian veterinary research* 2008; 45:5-14.
19. Costa APA, Nasciutti PR, Santos Junior MB, Silva RA, Carvalho ROA. Utilização de biomarcadores para avaliação da função cardíaca em pequenos animais. *Enciclopédia Biosfera* 2014; 10(18):2989-3005.
20. Ware WA. Myocardial diseases of the dog. In: Ware WA, editor. *Cardiovascular disease in small animal medicine*. London: Manson Publishing Ltd; 2011. p.280-299.
21. Boswood A. Current use of pimobendan in canine patients with heart disease. *Vet Clin Small Anim* 2010; 40:571-80.
22. Fuentes VL. Use of pimobendan in the management of heart failure. *Vet Clin Small Anim* 2004; 34:1145-1155.
23. Boyle KL, Leech E. A review of the pharmacology and clinical uses of pimobendan. *J Vet Emerg Crit Care* 2012; 22(4):398-408.
24. Fuentes VL. Treatment of congestive heart failure. In: Fuentes VL, Johnson LR, Dennis S, editors. *BSAVA Manual of canine and feline cardiorespiratory medicine*. 2. ed. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association; 2010. p. 153-159.
25. Houser SR, Margulies KB, Murphy AM, Spinale FG, Francis GS, Prabhu SD, Rockman HA, Kass DA, Molkentin JD, Sussman MA, Koch WJ. Animal models of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association. *Circ Res* 2012; 111:131-150.
26. Recchia FA, Lionetti V. Animal models of dilated cardiomyopathy for translational research. *Vet Res Commun* 2007; 31(suppl.1):35-41.
27. Pogwizd SM, Bers DM. Rabbit models of heart disease. *Drug Discov Today Dis Models* 2008; 5(3):185-193.
28. Milani-Nejad N, Janssen PML. Small and large animal models in cardiac contraction research: advantages and disadvantages. *Pharmacology & therapeutics* 2014; 141:235-249.

29. Gava FN, Zacché E, Ortiz EMG, Champion T, Bandarra MB, Vasconcelos RO, Barbosa JC, Camacho AA. Doxorubicin induced dilated cardiomyopathy in a rabbit model: An update. *Res Vet Sci* 2013; 94:115-121.
30. Talavera J, Giraldo A, Fernandez-Del-Palacio MJ, Garcia-Nicolas O, Seva J, Brooks G, Moraleda JM. An upgrade on the rabbit model of anthracycline-induced cardiomyopathy: shorter protocol, reduced mortality, and higher incidence of overt dilated cardiomyopathy. *Biomed Res Int* 2015; 2015:13p.
31. McMurray JJV, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Kober L, Lip GYH, Maggioni AP, Parkhomenko A, Piesk BM, Popescu BA, Ronnevik PK, Rutten FH, Schwitter J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeiher A. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012. *Eur J Heart Fail* 2012; 14:803-869.
32. Sudo RT, Albuquerque EX, Barreiro EJ, Yasco A, Cintra WM, Melo PA, Noel FG, Sudo GZ, Silva CLM, Castro NG, Fernandes PD, Fraga CAM, Miranda ALP, inventors. Thienylhydrazon with digitalis-like properties (Positive inotropic effects). United States. US 7091238 B1. 2006 Aug 15.
33. Sudo RT, Zapata-Sudo G, Barreiro EJ. The new compound, LASSBio 294, increases the contractility of intact and saponin-skinned cardiac muscle from Wistar rats. *Br J Pharmacol* 2001; 134:603-613
34. Barreiro EJ. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. *Quim Nova* 2002; 25(6B):1172-1188.
35. Silva CLM, Noel F, Barreiro EJ. Cyclic GMP-dependent vasodilatory properties of LASSBio 294 in rat aorta. *Br J Pharmacol* 2002; 135:293-298.
36. Costa DG, Silva JS, Kummerle A, Sudo RT, Landgraf SS, Caruso-Neves C, Fraga CAM, Barreiro EJL, Zapata-Sudo G. LASSBio 294, a compound with inotropic and lusitropic activity, decreases cardiac remodeling and improves  $Ca^{2+}$  influx into sarcoplasmic reticulum after myocardial infarction. *Am J Hypertens* 2010; 23(11):1220-1227.
37. Passos ACBT. Avaliação clínica e farmacocinética de um novo protótipo de fármaco cardiotônico (LASSBio-294) em cães hípidos. [Tese]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia; 2012.
38. Torres ACB, Nasciutti PR, Brasil RCOL, Oliveira PN, Souza MC, Bittar IP, De Oliveira V, Barreiro EJ, Oliveira Alves R. The action of a new prototype cardiotonic drug (Lassbio 294) on the cardiovascular system of dogs. *ACVIM 2012 Forum Proceedings. Cardiology Research & Review*. New Orleans: J Vet Int Med; 2012. 26:193-195.
39. Carneiro EO, Andrade CH, Braga RC, Tôrres ACB, Alves RO, Lião LM, Fraga CAM, Barreiro EJ, Oliveira V. Structure-based prediction and biosynthesis of the major mammalian metabolite of the cardioactive prototype LASSBio-294. *Bioorg Med Chem Lett* 2010; 20:3734-3736.
40. Braga RC, Tôrres ACB, Persiano CB, Alves RO, Fraga CAM, Barreiro EJ, Oliveira V. Determination of the cardioactive prototype LASSBio-294 and its metabolites in dog plasma

by LC-MS/MS: application for a pharmacokinetic study. J Pharm Biomed Anal 2011; 55:1024-1030.

41. Fraga AGM, Silva LL; Fraga CAM, Barreiro EJ. CYP1A2-mediated biotransformation of cardioactive 2-thienylidene- 3,4-methylenedioxybenzoylhydrazine (LASSBio-294) by rat liver microsomes and human recombinant CYP enzymes. Eur J Med Chem 2011; 46:349-355.

## **CAPÍTULO 2 – DISFUNÇÃO SISTÓLICA INDUZIDA POR DOXORRUBICINA EM COELHOS: VANTAGENS E DESVANTAGENS**

### **SISTOLIC DYSFUNCTION INDUCED BY DOXORRUBICIN IN RABBITS: ADVANTAGES AND DISADVANTAGES**

#### **RESUMO**

A cardiomiopatia dilatada (CMD) induzida por doxorubicina é o modelo mais utilizado na espécie leporina, existindo distintos protocolos estabelecidos para a espécie, os quais avaliam a cardiotoxicidade do fármaco, sem, no entanto, avaliar a espécie como modelo de estudo. Pensando nisso, a CMD foi induzida em vinte coelhos Nova Zelândia, utilizando a dose de 1mg/Kg de doxorubicina, sendo os parâmetros cardiovasculares avaliados por meio de exames eletrocardiográficos, ecodopplercardiográficos, mensuração da pressão arterial, radiografia torácica, dosagem de biomarcadores de lesão cardíaca, de função renal e hepática e avaliação hematológica. Conclui-se que o modelo de CMD induzida por doxorubicina é um bom modelo para estudo da doença e suas consequências, visto que induz disfunção sistólica e diastólica do miocárdico, com dilatação do ventrículo esquerdo. Porém, a resposta à cardiotoxicidade da doxorubicina é individual entre animais da mesma espécie, o que faz com que o tempo para a indução da CMD seja inexato e a ocorrência de toxicidade multissistêmica, como as supostas mielossupressão e nefrotoxicidade, contribui para a elevada taxa de mortalidade no modelo.

Palavras-chave: cardiopatia, leporino, disfunção sistólica, disfunção diastólica

#### **ABSTRACT**

Dilated cardiomyopathy (DCM) induced by doxorubicin is the most used model in leporine species existing different protocols established for the species, which assesses cardiotoxicity of the drug, without evaluating the species as study template. Thinking about it, the DCM was induced in 20 New Zealand rabbits, using a dose of 1 mg/kg, and cardiovascular parameters evaluated by electrocardiography, echodopplercardiography, measurement of blood pressure, chest radiograph, dosage of cardiac lesions, and kidney and liver functions biomarkers and hematologic evaluation. At the end of the study it was concluded that the DCM model induced by doxorubicin is a good model to study the disease and its consequences, as that it induces systolic and diastolic dysfunction with left ventricular dilatation. However, the response to the cardiotoxicity of doxorubicin is individual between animals of the same species, which causes the time for induction of DCM to be inaccurate and the occurrence of multisystemic toxicity, such as myelosuppression and nephrotoxicity contributes to higher mortality rate in this model.

Keywords: heart disease, leporine, systolic dysfunction, diastolic dysfunction

## 1. INTRODUÇÃO

Insuficiência cardíaca (IC) é a via final comum às diversas cardiopatias, correspondendo à fase em que os mecanismos compensatórios do organismo foram suplantados. Apesar dos avanços no que diz respeito ao tratamento, a busca por novas estratégias terapêuticas ainda se faz necessária. Uma das enfermidades cuja via final é a IC é a cardiomiopatia dilatada (CMD), que é a miocardiopatia mais comum tanto em medicina quanto na medicina veterinária, sendo responsável por aproximadamente 60% dos casos em seres humanos. A CMD é a causa mais comum de transplante cardíaco, tanto em adultos como em crianças, sendo considerada doença de alta morbidade e mortalidade<sup>1-4</sup>.

Para que um protótipo torne-se fármaco, é preciso que passe por testes, tanto em animais quanto em humanos. O modelo ideal para a realização de testes farmacológicos deve apresentar como características a disponibilidade de controles saudáveis, ausência de fatores como diferença de idade entre os indivíduos, ou a presença de outras enfermidades ou terapias concomitantes, fatores que não são possíveis de controlar quanto se trabalha com grupos de pacientes portadores da doença de ocorrência natural. Por esses motivos, a utilização de modelos animais experimentais em ensaios pré-clínicos é tão vantajosa quando comparada aos testes utilizando indivíduos provenientes da rotina clínica<sup>5</sup>.

Idealmente, o modelo experimental de CMD deve apresentar dilatação esférica do ventrículo esquerdo, com ou sem diminuição da espessura da parede ventricular, redução da relação massa/volume ventricular e funções sistólica e diastólica comprometidas. Dentre os pequenos animais, os roedores se destacam pelo baixo custo e facilidade de manipulação, o que torna possível a utilização de uma grande amostragem de sujeitos, aumentando a acurácia estatística do estudo. Porém, diferenças estruturais e fisiológicas entre roedores e humanos fazem com que todo novo fármaco deva ser também testado em uma espécie mamífera não roedora<sup>6</sup>.

Dentre os mamíferos não roedores de porte médio utilizados como modelo de CMD, destacam-se os coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). O modelo leporino é vantajoso devido a seu peso corpóreo permitir a realização de procedimentos não invasivos para avaliação hemodinâmica. O modelo de CMD não isquêmica induzida por doxorrubicina ou outras antraciclinas tem sido o mais utilizado nessa espécie. Esse modelo permite induzir a doença por meio de insulto tóxico aos cardiomiócitos, produzindo grande dilatação cardíaca, hipertrofia do ventrículo esquerdo e disfunção sistólica deste, de forma progressiva e



irreversível, acompanhada de sinais de insuficiência cardíaca como retenção de fluidos e ativação do sistema nervoso simpático e do sistema renina-angiotensina-aldosterona<sup>6,7</sup>.

Existem vários protocolos propostos para a indução de CMD por doxorrubicina, utilizando distintas doses e períodos de indução, com alta variabilidade na obtenção de disfunção sistólica<sup>8-10</sup>. Os modelos propostos avaliaram a cardiotoxicidade da doxorrubicina para a espécie leporina, porém não apontaram as vantagens e desvantagens de sua utilização como modelo para indução da CMD e posteriores estudos farmacológicos, tampouco acompanharam os animais até a fase em que todos os sujeitos estavam em disfunção sistólica. Visto isso, este estudo objetivou avaliar o modelo leporino de cardiomiopatia dilatada induzida por doxorrubicina, para produção de disfunção sistólica, proporcionando a utilização destes animais para estudos que tenham como alvo o tratamento de doenças miocárdicas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo obedeceu aos preceitos da Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório, tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFG sob o protocolo número 006/14 (Anexo 1).

### 2.1 Animais e Indução da Cardiomiopatia Dilatada

Foram adquiridos, de um produtor local (Coelho Forte – Bela Vista - GO), 20 coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*). Os animais foram submetidos a avaliação clínica e laboratorial para confirmação de sua higidez e então alojados na Unidade Experimental de Roedores e Lagomorfos da EVZ/UFG em gaiolas individuais, com temperatura ambiente controlada a 24°C, com livre acesso a água e ração, sendo oferecida cenoura ou folhagem escura, uma vez por semana.

Para a indução da cardiomiopatia dilatada foi administrada doxorrubicina na dose 1mg/Kg (Cloridrato de Doxorrubicina®, Eurofarma, São Paulo, SP), via endovenosa, na concentração de 2mg/mL, duas vezes por semana, durante três semanas e, posteriormente, uma vez por semana até que os coelhos apresentassem fração de encurtamento igual ou inferior a 25% à avaliação ecocardiográfica, configurando disfunção sistólica. A administração da doxorrubicina foi feita via endovenosa auricular, utilizando agulha 21G, em bolus lento, após tricotomia e desinfecção prévia da orelha dos coelhos. A concentração de 2mg/mL de Doxorrubicina foi obtida pela diluição de 50mg dessa em solução salina 0,9%. O

protocolo de indução da cardiomiopatia dilatada em coelhos seguiu a dose e tempo propostos por Gava et al.<sup>9</sup>.

Os coelhos foram submetidos a avaliação cardiológica, antes da indução da CMD e a cada 15 dias, até o tempo de 45 dias ou até que houvesse disfunção sistólica, à avaliação ecodopplercardiográfica (T0-T15-T30-T45-CMD). Os seguintes exames compuseram a avaliação cardiológica dos animais: eletrocardiograma, ecodopplercardiograma, avaliação da pressão arterial, avaliação radiográfica torácica, dosagem de biomarcadores de lesão cardíaca, e de função renal e hepática e avaliação hematológica.

## 2.2 Avaliação eletrocardiográfica

Para a obtenção do eletrocardiograma (ECG), foi utilizado aparelho computadorizado – módulo de aquisição de ECG para computador/ECG-PC (versão 6.2 – Revisão 1 Copyright© 1997-2011 - Tecnologia Eletrônica Brasileira –TEB), na velocidade de 50mm/s e calibrado para 1mV igual a 1cm<sup>11</sup>, sendo os registros arquivados em microcomputador.

Com os animais contidos em decúbito esternal, em cada membro locomotor foi acoplado um eletrodo, permitindo a obtenção simultânea dos traçados eletrocardiográficos nas derivações bipolares DI, DII e DIII, e nas unipolares aVR, aVL e aVF, monitorados durante cinco minutos.

As análises dos registros foram realizadas na derivação DII, em 2N, com a obtenção dos seguintes parâmetros: ritmo e frequência cardíaca (bpm), duração (segundos) e amplitude (mV) da onda P e do complexo QRS, duração dos intervalos P-R e Q-T, amplitude da onda T e eixo cardíaco elétrico médio, no plano frontal, expresso em graus, considerando os valores publicados para a espécie<sup>12,13</sup>.

## 2.3 Avaliação ecodopplercardiográfica

O estudo ecodopplercardiográfico foi realizado utilizando o aparelho de ecodopplercardiografia (My Lab30Vet – Esaote/Pie Medical).

Para a realização dos ecodopplercardiogramas os animais foram submetidos a tricotomia do tórax e posicionados sequencialmente em decúbito lateral direito e esquerdo para a obtenção das imagens, seguindo-se a aplicação de gel acústico para uma melhor condução das ondas<sup>12</sup>. Utilizando transdutor multifrequencial *phased array* de 7,5/10,0MHz

posicionando-o nas janelas paraesternal direita e esquerda, as imagens foram obtidas e analisadas de acordo com o preconizado por Bonagura & Fuentes<sup>14</sup> e Boon<sup>15</sup>.

Foram utilizados os modos bidimensional, modo-M, Doppler pulsado (PW), Doppler contínuo (CW), fluxo em cores (CF) e Doppler Tecidual (DT). A avaliação qualitativa do coração foi obtida pelo modo bidimensional, fornecendo informações quanto ao movimento, anatomia cardíaca e relação espacial, bem como servindo de orientação para as imagens em modo-M, por meio do qual foi realizada análise quantitativa, em sístole e diástole, das dimensões das câmaras cardíacas, espessura da parede livre do ventrículo esquerdo e do septo interventricular e avaliação dos movimentos valvares, permitindo, assim, cálculos de índices funcionais como a fração de encurtamento e fração de ejeção<sup>15</sup>.

Por meio da ecocardiografia Doppler (pulsado, contínuo e de fluxo em cores), foram identificados os fluxos sanguíneos transvalvares, quantificando-os quanto à direção, velocidade e turbulência, estabelecendo a presença ou ausência de insuficiência valvar decorrente de regurgitações. O Doppler de fluxo em cores foi empregado para permitir melhor e adequada identificação e avaliação qualitativa do fluxo sanguíneo, bem como para auxiliar o posicionamento do cursor para a sua avaliação quantitativa.

O Doppler pulsado permitiu mensurar a função diastólica dos coelhos por meio da avaliação do fluxo transmitral, obtendo-se os valores de velocidade máxima da onda E (Vmáx. E), velocidade máxima da onda A (Vmáx. A), relação E/A (E/A) e tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV). A avaliação ecocardiográfica Doppler tecidual do anel mitral e da parede livre do ventrículo esquerdo, em cortes transversal e apical, permitiram a avaliação quantitativa da velocidade de movimentação do miocárdio, consequentemente da função diastólica dos coelhos, por meio do cálculo da velocidade diastólica precoce (E'), velocidade diastólica tardia (A'), relação E'/A', e relação E/E'.

Os ecodopplercardiogramas foram realizados e analisados de acordo com os critérios da Sociedade Americana de Ecocardiografia e do Comitê de Ecocardiografia do Colégio Americano de Medicina Interna Veterinária<sup>15,16</sup>. Os valores obtidos foram analisados de acordo com os publicados para a espécie<sup>12,13,17,18</sup>.

## 2.4 Mensuração da pressão arterial

A pressão arterial foi mensurada utilizando-se o método Doppler, com aparelho Parks Medical Ultrasonic Doppler 812® (Parks Medical, Estados Unidos) e esfigmomanômetro Henik Gamma G5 (Heine, Alemanha). Em um ambiente tranquilo e

climatizado os coelhos foram contidos em decúbito esternal sobre uma mesa, tendo o manguito do aparelho acoplado na posição distal do rádio e ulna esquerdos e posicionamento do transdutor sob a região das artérias palmares comuns, próximo às articulações dos carpos com metacarpos. A circunferência do membro locomotor de cada animal foi mensurada para determinação do comprimento e largura ideais do manguito (largura=40% da circunferência do membro e comprimento=1,5 vezes a circunferência do membro). O manguito foi colocado no nível do átrio direito<sup>19,20</sup>. Em cada avaliação, foram obtidas cinco tomadas consecutivas da pressão arterial sistólica (PAS) de cada animal, descartando as duas mais discrepantes. O valor final de cada um desses parâmetros foi representado pela média aritmética das três mensurações restantes<sup>20</sup>.

Após a mensuração da pressão arterial pelo método Doppler, utilizou-se o método Oscilométrico (PetMap<sup>®</sup>, Ramsey Medical Inc., Estados Unidos). Após o aparelho ter sido ligado, este foi conectado ao mesmo manguito utilizado com método Doppler, então, realizou-se, a mensuração da pressão. Em cada avaliação, foram obtidas cinco tomadas consecutivas das pressões arteriais sistólica (PAS), diastólica (PAD), média (PAM) e da frequência cardíaca de cada animal, descartando a menor e a maior mensuração e sendo o valor final a média aritmética das três mensurações<sup>19,20</sup>. As mensurações foram realizadas por um único avaliador para minimizar a variação individual.

## 2.5 Avaliação radiográfica do tórax

Os exames radiográficos do tórax foram realizados utilizando o aparelho de Raios-X fixo, da marca Philips modelo KL.74/20.40 (Philips Healthcare<sup>®</sup>, Biassono, Itália), com capacidade para 500mA. Foram empregados cassetes radiográficos 18x24cm da marca Fuji IP cassette type CC. Os cassetes foram lidos em reveladora computadorizada da marca Fujifilm, modelo CR-IR (Fujifilm Corporation, Tóquio, Japão) e após obtidas as imagens foram trabalhadas em software OsiriX lite<sup>®</sup> (Pixmeo<sup>®</sup> SARL, Genebra, Suíça).

Para realização do exame radiográfico, os coelhos foram posicionados em decúbito lateral direito para realização de projeção laterolateral direita e em decúbito dorsal, para projeção ventrodorsal. A análise das radiografias foi realizada pelo método de mensuração "Vertebral Heart Size", descrito por Buchanan & Bücheler<sup>21</sup>. Adjunto foi avaliada a radiopacidade pulmonar como descrito por Thrall<sup>22</sup>, descrevendo-se achados sugestivos de acúmulos de líquidos (edema pulmonar), avaliando-se também o espaço pleural quanto ao acúmulo de líquidos indicativos de efusão pleural.

## 2.6 Avaliação hematológica e bioquímica

As amostras de sangue (5,0mL) foram coletadas em dia posterior às demais avaliações cardiológicas, para evitar alterações hematológicas provocadas pelo estresse, por venopunção társica, localizada na face lateral do membro pélvico, sendo realizada tricotomia da região e aplicação de pomada anestésica dez minutos antes da coleta. Dos 5,0mL coletados, 0,5mL foi acondicionado em frasco com etilenodiaminotetracetato (EDTA) e o restante em frasco sem anticoagulante. As amostras de sangue foram centrifugadas a 1500 rotações por minuto (rpm) durante dez minutos, para separação do soro e posteriormente divididas e acondicionadas em tubos de *eppendorf*.

Os hemogramas foram realizados em analisador automático modelo BC-2800 vet<sup>®</sup> (Mindray, Pequim, China) e as contagens diferenciais dos leucócitos foram realizadas em esfregaços de sangue fixados em metanol e corados por Giemsa-MMG.

Para as análises bioquímicas foram utilizados kits comerciais padronizados Labtest<sup>®</sup> (Labtest Diagnóstica S. A., Lagoa Santa – MG), sendo a leitura realizada em espectrofotômetro semi-automático (Analisador Bioquímico Automático CM200<sup>®</sup>, Winerlab, Rosário, Argentina). Os kits e as metodologias utilizados encontram-se dispostos no Quadro 1.

QUADRO 1 – Kits e métodos utilizados para avaliar parâmetros bioquímicos em coelhos com cardiomiopatia dilatada induzida por doxorubicina:

<b>KIT</b>	<b>FINALIDADE</b>	<b>MÉTODO</b>
<b>Albumina</b>	Sistema para determinação de albumina em amostras de soro	Colorimétrico (Verde de Bromocresol)
<b>ALT/GPT Liquiform</b>	Sistema para determinação da alanina amino transferase (ALT) ou transaminase glutâmico pirúvica (GGT) em modo cinético	Cinética UV-IFCC
<b>AST/GOT Liquiform</b>	Sistema para determinação quantitativa em modo cinético contínuo da aspartato amino transferase (AST) em soro ou plasma	Cinética UV-IFCC
<b>Cálcio Liquiform</b>	Sistema para determinação do cálcio por reação de ponto final em amostras de sangue e urina	Colorimétrico (CPC-Cresolfaleína)
<b>CK-MB Liquiform</b>	Sistema para determinação quantitativa da atividade da isoenzima MB da creatinaquinase (CK-MB) em modo cinético em soro ou plasma	UV-Imunoinibição-IFCC
<b>CK-Nac Liquiform</b>	Sistema para determinação em modo cinético da creatinaquinase total (CK) em soro ou plasma	UV-IFCC
<b>Creatinina K</b>	Sistema para a determinação quantitativa da creatinina em amostras de soro, plasma e urina e líquido amniótico por reação cinética de dois pontos	Colorimétrico (Picrato Alcalino – Jaffé)
<b>Fosfatase Alcalina Liquiform</b>	Sistema para determinação da fosfatase alcalina (ALP) em soro	Colorimétrica (Bowers e MC Comb modificado)
<b>Fósforo UV Liquiform</b>	Sistema para determinação do fósforo inorgânico por fotometria em ultravioleta, com reação de ponto final, em soro, plasma e urina	UV (Daly e Erteingshausen modificado)
<b>LDH Liquiform</b>	Sistema para a determinação em modo cinético da desidrogenase láctica (LDH) em amostra de soro ou plasma	UV – Método Piruvato-Lactato
<b>Potássio enzimático</b>	Sistema para determinação quantitativa do íon potássio em amostras de soro, por reação enzimática, em modo cinético	Enzimática
<b>Proteínas totais</b>	Sistema para a determinação das proteínas totais em amostras de soro e líquidos pleural, sinovial e ascítico por reação de ponto final	Colorimétrica (Biureto)
<b>Uréia UV liquiform</b>	Sistema enzimático para determinação da uréia por fotometria em ultravioleta usando cinética de dois pontos (Tempo fixo)	Enzimático UV

## 2.7 Avaliação anatomopatológica

Os animais que morreram durante a indução da CMD e antes de desenvolver disfunção sistólica foram submetidos à necropsia para avaliação anatomopatológica. Outros seis corações de coelhos saudáveis foram empregados para confecção de lâminas controle.

Os corações foram coletados inteiros e armazenados em frascos individuais, identificados, contendo solução de formalina tamponada a 10%. Decorridas 48 horas de fixação, os corações foram cortados e os fragmentos processados e incluídos em parafina. Em seguida, foram confeccionados cortes histológicos de 5µm, que foram distendidos sobre lâminas de vidro e corados com Hematoxilina Eosina (HE) e Tricrômico de Masson.

As alterações microscópicas foram avaliadas de acordo com critérios adaptados de por Gava et al.<sup>9</sup>, considerando as variáveis vacuolização citoplasmática, fragmentação de miofibrilas, edema intersticial, necrose e fibrose. As alterações foram avaliadas de acordo com sua extensão nos fragmentos de miocárdio, sendo atribuído o escore (0) quando ausentes; um (1) quando em localização focal; dois (2) quando focal e extensa ou multifocal restrita; e três (3) quando lesões difusas ou multifocais envolvendo todo o fragmento avaliado.

## 2.8 Análise estatística

O experimento foi conduzido em esquema de delineamento inteiramente casualizado onde os tratamentos são os momentos (T0-T15-T30-T45-CMD) e cada animal uma unidade experimental. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas empregando-se teste de Tukey para avaliação, adotando-se nível de significância de 5%. O teste de normalidade utilizado foi o Shapiro-Wilk, empregando-se *software* estatístico R<sup>®</sup> (The R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria).

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Mortalidade

Durante o período de indução, sete (35%) dos vinte coelhos que iniciaram o estudo morreram, sendo um com dose acumulada de 4mg/Kg de doxorubicina, um com 5mg/Kg e cinco com 6mg/Kg. Frente ao grande número de óbitos observados, nas três primeiras semanas de indução, o protocolo foi alterado para aplicações semanais de 1mg/Kg de doxorubicina e, a partir desse momento não foram mais observados óbitos no período de indução da CMD.

Sendo assim, treze coelhos sobreviveram ao protocolo de indução da CMD, e desenvolveram disfunção sistólica, sendo que desses, três animais desenvolveram CMD com 45 dias (9mg/Kg), 60 dias (11mg/Kg) e 67 dias (12mg/Kg) de indução, respectivamente, quatro desenvolveram CMD com 75 dias (13mg/Kg) e quatro com 90 dias (15mg/Kg), outros dois desenvolveram no 105º dia (17mg/Kg) do protocolo de indução.

### 3.2 Avaliação anatomopatológica

Dois dos sete coelhos que morreram durante o protocolo de indução da CMD apresentavam sinais de autólise e não foram avaliados macroscopicamente. Os cinco coelhos restantes apresentavam alterações multissistêmicas à avaliação macroscópica. Em comum, os cinco apresentaram alterações gastrointestinais (Figura 1), que incluíam petéquias e sufusões em mucosa gástrica, com coágulos intraluminais e, em alguns casos, foram observadas úlceras gástricas (1/5) e ruptura gástrica (2/5). Dois coelhos (40%) apresentavam líquido amarelado livre em cavidade abdominal. Alterações de morfologia cardíaca foram observadas em três coelhos, sendo que dois desses apresentavam aumento de ventrículo direito e hemopericárdio e o terceiro apresentava petéquias no miocárdio e hidropicárdio. Também foram observadas alterações no trato respiratório, que incluíram presença de secreção sanguinolenta na traqueia (1/5) e pulmões congestionados (2/5).

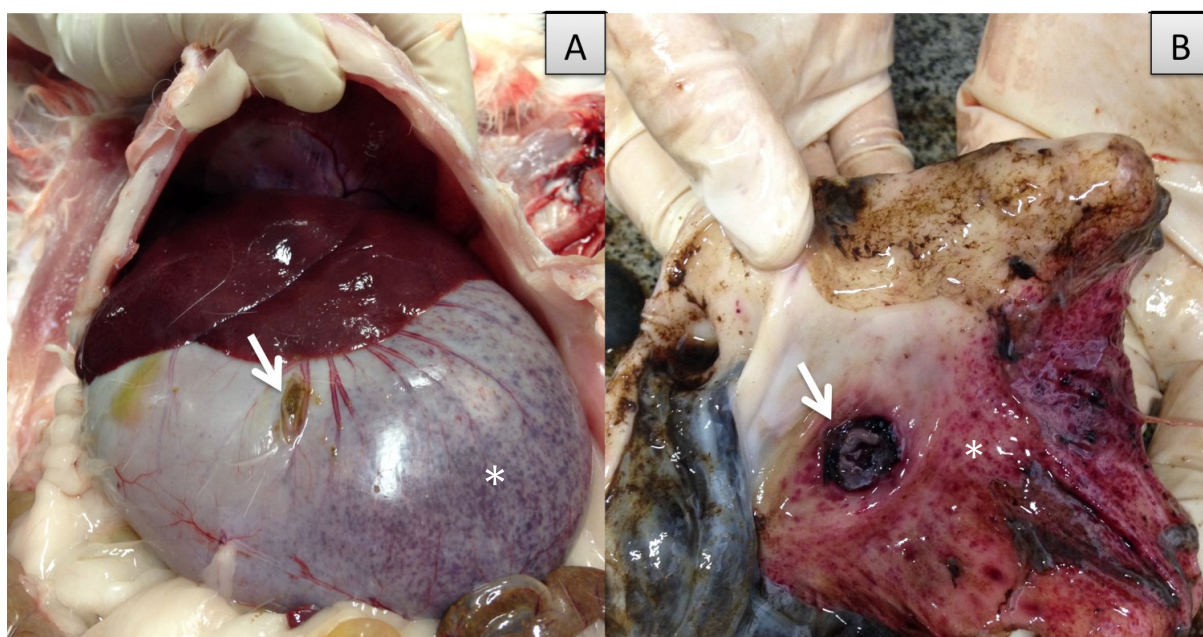


FIGURA 1: Alterações macroscópicas observadas em coelhos Nova Zelândia submetidos a indução CMD por doxorubicina. Em A: Nota-se petéquias e sufusões (asterisco) e ruptura gástrica (seta). Em B: Nota-se sufusão (asterisco) e úlcera (seta) em mucosa gástrica.



Devido a perdas por autólise, a avaliação microscópica foi realizada no coração de três dos sete animais mortos durante o período de indução da CMD. No coração dos referidos coelhos, constataram-se edema intersticial, fragmentação de miofibrilas e hemorragia. Vacuolização citoplasmática, necrose e fibrose foram observadas em dois dos três corações. Ainda, as extensões das lesões variaram entre os fragmentos avaliados, sendo graduadas com escores de um a três. A figura 2 ilustra o edema observado à avaliação microscópica.

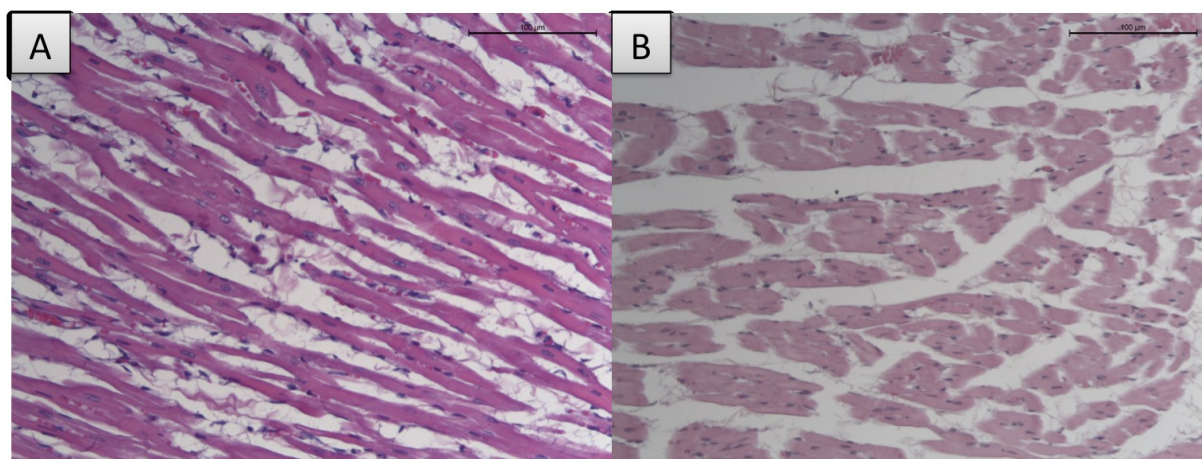


FIGURA 2: Fotomicrografias de tecido cardíaco de coelho Nova Zelândia saudável (A) e tratado com doxorubicina (B). B: Edema intersticial com perda de orientação das miofibrilas. Hematoxilina e Eosina. Objetiva: 20x.

### 3.3 Avaliação eletrocardiográfica

Os animais submetidos à indução da CMD por doxorubicina apresentaram aumento da duração do intervalo Q-T, no momento T15. A amplitude da onda P diminuiu nos momentos T30 e CMD. A frequência cardíaca foi significativamente menor que em T0 no momento T45 (Tabela 1). As ondas T foram positivas durante todo o período de indução, com exceção de dois animais que apresentaram ondas T bifásicas, no momento 90. As demais variáveis não apresentaram alterações significativas.

Em relação ao ritmo cardíaco, no momento T0 dois coelhos apresentaram taquicardia sinusal e um apresentou essa alteração no momento T15, os demais apresentaram ritmo sinusal em todos os momentos. Nos momentos T30 e T45, um coelho apresentou complexos ventriculares prematuros (CVP) (Figura 3B). Considerando o momento CMD, aos 60 dias, três coelhos apresentaram CVPs. Aos 75 dias, 40% dos animais apresentaram CVPs, sendo que dois animais apresentaram complexos aos pares, isolados e em salvas. Aos 90 dias, um coelho apresentou CPVs. Aos 105 dias, décima quarta semana de indução, os dois coelhos restantes não apresentaram CVPs, apresentando ritmo sinusal (Figura 3A).

TABELA 1 - Médias de amplitude e duração das ondas P, complexo QRS, duração do intervalo P-R e Q-T e frequência cardíaca de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos, submetidos a indução da cardiomiopatia dilatada (CMD) por doxorrubicina e avaliados quinzenalmente (T0, T15, T30, T45, CMD). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016).

Variável	Momentos				
	T0	T15	T30	T45	CMD
P (ms)	34,58 <sup>a</sup>	34,54 <sup>a</sup>	35,39 <sup>a</sup>	33,46 <sup>a</sup>	30,95 <sup>a</sup>
P-R (ms)	61,43 <sup>a</sup>	61,83 <sup>a</sup>	61,99 <sup>a</sup>	62,55 <sup>a</sup>	60,04 <sup>a</sup>
QRS (ms)	43,93 <sup>ab</sup>	42,75 <sup>a</sup>	49,71 <sup>b</sup>	48,69 <sup>ab</sup>	47,15 <sup>ab</sup>
Q-T (ms)	129,41 <sup>a</sup>	143,69 <sup>b</sup>	142,62 <sup>ab</sup>	142,18 <sup>ab</sup>	131,44 <sup>ab</sup>
P (mV)	0,05 <sup>a</sup>	0,05 <sup>a</sup>	0,03 <sup>b</sup>	0,04 <sup>ab</sup>	0,03 <sup>b</sup>
R (mV)	0,12 <sup>ab</sup>	0,14 <sup>a</sup>	0,12 <sup>ab</sup>	0,13 <sup>a</sup>	0,09 <sup>b</sup>
Eixo	49,45 <sup>a</sup>	51,34 <sup>a</sup>	27,63 <sup>a</sup>	30,66 <sup>a</sup>	45,66 <sup>a</sup>
FC (bpm)	233 <sup>a</sup>	207 <sup>ab</sup>	201 <sup>ab</sup>	193 <sup>b</sup>	215 <sup>ab</sup>

Teste de Tukey, adotando-se nível de significância de 5%

Letras iguais significam que não houve diferença estatística entre os diferentes momentos.

Números em vermelho indicam diferença estatística com o T0

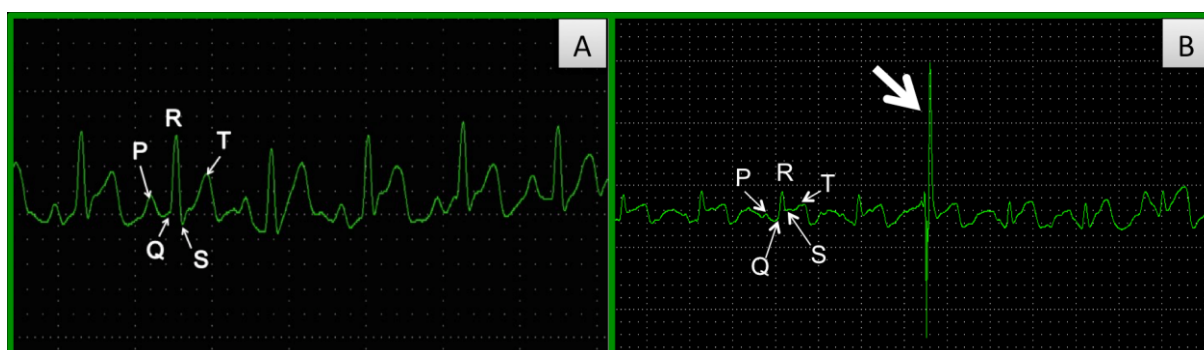


FIGURA 3 - Traçados eletrocardiográficos computadorizados, derivação II, calibração 2N, velocidade 50mm/s, obtidos de coelhos da raça Nova Zelândia, antes da indução da cardiomiopatia dilatada (A) e aos 30 dias de tratamento com doxorrubicina na dose cumulativa de 8mg/Kg (B). Na figura B a seta grande identifica um complexo QRS bizarro, caracterizando um complexo ventricular prematuro.

### 3.4 Avaliação ecodopplercardiográfica

A avaliação ecocardiográfica em modo M e bidimensional mostrou aumento das dimensões internas do ventrículo esquerdo em sístole e diástole, com diminuição das paredes livres do VE e do septo interventricular a partir do trigésimo dia de indução (Tabela 2). Nesse mesmo momento também verificou-se diminuição dos índices de função sistólica do VE, observando-se quedas significativas e progressivas (Figura 4).

TABELA 2: Médias obtidas a partir da avaliação das imagens em modo-B e modo-M de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos, submetidos a tratamento com doxorubicina para indução de cardiomiopatia dilatada (CMD) e avaliados quinzenalmente (T0,T15, T30,T45, CMD). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016).

Variável	Momentos				
	T0	T15	T30	T45	CMD
Ao mm	7,80 <sup>a</sup>	7,54 <sup>a</sup>	8,11 <sup>a</sup>	7,81 <sup>a</sup>	7,86 <sup>a</sup>
AE mm	9,96 <sup>a</sup>	9,22 <sup>a</sup>	9,75 <sup>a</sup>	9,92 <sup>a</sup>	10,04 <sup>a</sup>
AE/Ao	1,29 <sup>a</sup>	1,23 <sup>a</sup>	1,21 <sup>a</sup>	1,28 <sup>a</sup>	1,30 <sup>a</sup>
DIVEs mm	8,27 <sup>a</sup>	7,57 <sup>a</sup>	10,20 <sup>b</sup>	10,92 <sup>b</sup>	11,69 <sup>b</sup>
DIVED mm	12,84 <sup>a</sup>	12,29 <sup>a</sup>	14,95 <sup>b</sup>	15,67 <sup>b</sup>	15,52 <sup>b</sup>
PLVEs mm	4,10 <sup>ab</sup>	4,35 <sup>a</sup>	3,21 <sup>c</sup>	3,62 <sup>bc</sup>	2,56 <sup>d</sup>
PLVDd mm	3,89 <sup>a</sup>	3,91 <sup>a</sup>	2,37 <sup>b</sup>	2,57 <sup>b</sup>	1,94 <sup>b</sup>
SIVs mm	3,92 <sup>a</sup>	4,30 <sup>a</sup>	2,93 <sup>b</sup>	2,85 <sup>b</sup>	2,14 <sup>c</sup>
SIVd mm	3,34 <sup>a</sup>	3,02 <sup>a</sup>	2,33 <sup>b</sup>	2,20 <sup>b</sup>	1,99 <sup>b</sup>
FE (%)	69,05 <sup>ab</sup>	71,66 <sup>a</sup>	63,49 <sup>bc</sup>	61,49 <sup>c</sup>	51,73 <sup>d</sup>
FS (%)	35,78 <sup>ab</sup>	38,06 <sup>a</sup>	31,94 <sup>b</sup>	30,74 <sup>b</sup>	24,30 <sup>c</sup>

Onde: Ao: diâmetro da aorta; AE: diâmetro do átrio esquerdo; AE/Ao: relação átrio esquerdo aorta; DIVE s/d: diâmetro interno do ventrículo esquerdo em sístole e diástole; PLVE s/d: parede livre do ventrículo esquerdo em sístole e diástole; SIV s/d: septo interventricular em sístole e diástole; FE: fração de ejeção; FS: fração de encurtamento

Teste de Tukey, adotando-se nível de significância de 5%

Letras iguais significam que não houve diferença estatística entre os diferentes momentos

Números em vermelho indicam diferença estatística com o T0

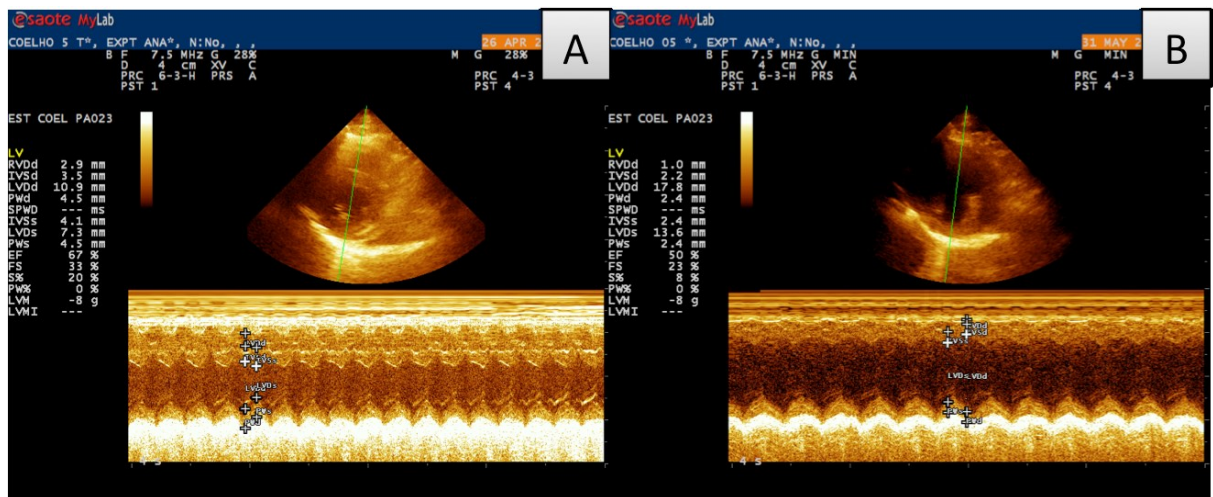


FIGURA 4: Imagens ecocardiográficas bidimensionais na parte superior e imagens em modo-M na parte inferior das figuras, obtidas pela janela paraesternal direita, de coelho Nova Zelândia, submetido a indução da cardiomiopatia dilatada com doxorubicina. Em A: Décimo quinto dia de indução, apresentando FS% de 33. Em B: Sexagésimo dia de indução, apresentando FS% de 23.

Não foram visibilizadas insuficiências valvares por meio da avaliação doppler colorida dos fluxos mitral, tricúspide, aórtico e pulmonar ao longo do período de indução da CMD. A avaliação Doppler pulsado do fluxo aórtico não apresentou variação significativa ao longo da indução da CMD. Em relação ao fluxo transmitral foi observado aumento gradativo da velocidade da onda A, observando-se nesse mesmo momento inversão da relação E/A. O fluxo tricúspide apresentou aumento da velocidade da onda E no momento T45, porém a relação E/A não variou significativamente, tampouco inverteu. O fluxo pulmonar apresentou aumento significativo de sua velocidade máxima ao trigésimo dia de indução da CMD. O tempo de relaxamento isovolumétrico do VE apresentou variações significativas durante o período de indução da CMD, observando-se aumento progressivo desse (Tabela 3).

TABELA 3: Médias dos valores ecodopplercardiográficos obtidos a partir da avaliação dos fluxos transvalvares de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos, submetidos a tratamento com doxorubicina para indução de cardiomiopatia dilatada (CMD) e avaliados quinzenalmente (T0,T15, T30,T45, CMD). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016).

Variável	Momentos				
	T0	T15	T30	T45	CMD
V <sub>máxE<sub>m</sub></sub> m/s	0,53 <sup>a</sup>	0,55 <sup>a</sup>	0,57 <sup>a</sup>	0,58 <sup>a</sup>	0,52 <sup>a</sup>
V <sub>máxA<sub>m</sub></sub> m/s	0,46 <sup>a</sup>	0,46 <sup>a</sup>	0,54 <sup>ab</sup>	0,48 <sup>ab</sup>	0,59 <sup>b</sup>
E/A <sub>m</sub>	1,16 <sup>ab</sup>	1,24 <sup>a</sup>	1,09 <sup>ab</sup>	1,26 <sup>a</sup>	0,93 <sup>b</sup>
V <sub>máxE<sub>t</sub></sub> m/s	0,53 <sup>a</sup>	0,59 <sup>ab</sup>	0,61 <sup>ab</sup>	0,66 <sup>b</sup>	0,53 <sup>ab</sup>
V <sub>máxA<sub>t</sub></sub> m/s	0,41 <sup>ab</sup>	0,36 <sup>b</sup>	0,48 <sup>a</sup>	0,43 <sup>ab</sup>	0,48 <sup>a</sup>
E/A <sub>t</sub>	1,34 <sup>a</sup>	1,60 <sup>a</sup>	1,36 <sup>a</sup>	1,56 <sup>a</sup>	1,23 <sup>a</sup>
V <sub>máxAo</sub> m/s	0,59 <sup>a</sup>	0,66 <sup>a</sup>	0,65 <sup>a</sup>	0,62 <sup>a</sup>	0,61 <sup>a</sup>
DC mL/min	0,69 <sup>a</sup>	0,69 <sup>a</sup>	0,69 <sup>a</sup>	0,61 <sup>a</sup>	0,60 <sup>a</sup>
V <sub>máxP</sub> m/s	0,70 <sup>a</sup>	0,71 <sup>ab</sup>	0,79 <sup>b</sup>	0,77 <sup>ab</sup>	0,76 <sup>ab</sup>
TRIV ms	44,81 <sup>a</sup>	34,99 <sup>b</sup>	43,86 <sup>a</sup>	50,94 <sup>a</sup>	50,17 <sup>a</sup>
VS mL	2,94 <sup>a</sup>	2,62 <sup>a</sup>	2,96 <sup>a</sup>	2,50 <sup>a</sup>	2,60 <sup>a</sup>

Onde: V<sub>máxE<sub>m</sub></sub>: velocidade máxima da onda E do fluxo mitral; V<sub>máxA<sub>m</sub></sub>: velocidade máxima da onda A do fluxo mitral; E/A<sub>m</sub>: relação entre as ondas E e A mitral; V<sub>máxE<sub>t</sub></sub>: velocidade máxima da onda E do fluxo tricúspide; V<sub>máxA<sub>t</sub></sub>: velocidade máxima da onda A do fluxo tricúspide; E/A<sub>t</sub>: relação entre as ondas E e A do fluxo tricúspide; V<sub>máxAo</sub>: velocidade máxima do fluxo aórtico; DC: débito cardíaco; V<sub>máxP</sub>: velocidade máxima do fluxo pulmonar; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; VS: volume sistólico

Teste de Tukey, adotando-se nível de significância de 5%

Letras iguais significam que não houve diferença estatística entre os diferentes momentos

Números em vermelho indicam diferença estatística com o T0

Por meio da avaliação Doppler tecidual foi possível verificar diminuição da velocidade da onda E' da parede livre do VE em corte transversal e na altura do anel mitral, em corte apical à partir do quadragésimo quatro dia de indução. Houve inversão da relação E'/A' em corte transversal na segunda, sexta e última semanas de avaliação e em corte apical na quarta e na sexta semana. A relação E/E' aumentou à partir do 45º dia de indução, tanto em corte transversal quanto na vista apical na altura do anel mitral (Tabela 4).

TABELA 4: Médias dos valores ecodopplercardiográficos obtidos a partir da avaliação Doppler tecidual da parede livre do VE em corte transversal e na altura do anel mitral em corte apical (L) de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos, submetidos a tratamento com doxorubicina para indução de cardiomiopatia dilatada (CMD), durante 45 dias e avaliados quinzenalmente (T0,T15, T30,T45, CMD). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016).

Variável	Momentos				
	0	15	30	45	CMD
E' m/s	0,07 <sup>a</sup>	0,07 <sup>a</sup>	0,07 <sup>ab</sup>	0,05 <sup>b</sup>	0,05 <sup>b</sup>
A' m/s	0,07 <sup>a</sup>	0,08 <sup>a</sup>	0,07 <sup>a</sup>	0,07 <sup>a</sup>	0,07 <sup>a</sup>
E'/A'	1,04 <sup>a</sup>	0,77 <sup>b</sup>	1,02 <sup>ab</sup>	0,78 <sup>ab</sup>	0,82 <sup>ab</sup>
E/E'	8,32 <sup>ab</sup>	7,58 <sup>b</sup>	8,87 <sup>ac</sup>	11,39 <sup>c</sup>	10,94 <sup>ac</sup>
E'L m/s	0,09 <sup>a</sup>	0,10 <sup>a</sup>	0,09 <sup>ab</sup>	0,06 <sup>c</sup>	0,06 <sup>bc</sup>
A'L m/s	0,08 <sup>a</sup>	0,08 <sup>a</sup>	0,09 <sup>a</sup>	0,11 <sup>a</sup>	0,08 <sup>a</sup>
E'/A'L	1,13 <sup>a</sup>	1,07 <sup>a</sup>	0,57 <sup>b</sup>	0,57 <sup>b</sup>	1,00 <sup>ab</sup>
E/E'L	6,28 <sup>a</sup>	6,02 <sup>a</sup>	7,12 <sup>ab</sup>	10,02 <sup>b</sup>	9,44 <sup>b</sup>

Onde: E'/E'L: velocidade diastólica precose parede livre do VE em corte transversal e apical na altura do anel mitral; A'/A'L: velocidade diastólica tardia da parede livre do VE em corte transversal e apical na altura do anel mitral; E'/A' e E'L/A'L: relação das velocidades diastólicas precose e tardia da parede livre do VE em corte transversal e apical na altura do anel mitral; E/E' e E/E'L: relação entre velocidade da onda E mitral e a velocidade diastólica precose da parede livre do VE em corte transversal e apical na altura do anel mitral

Teste de Tukey, adotando-se nível de significância de 5%

Cores iguais significam que não houve diferença estatística entre os diferentes momentos

Números em vermelho indicam diferença estatística com o T0

### 3.5 Mensuração da pressão arterial

A mensuração da pressão arterial foi obtida apenas com contenção física em decúbito esternal, com auxílio de uma toalha e sem intercorrências durante a manipulação dos animais. Os resultados obtidos nas mensurações da pressão arterial, estão representados na Tabela 5.



TABELA 5: Médias dos valores de pressão arterial mensurados pelos métodos Doppler e oscilométrico de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos e submetidos a tratamento com doxorubicina para indução de cardiomiopatia dilatada (CMD) e avaliados quinzenalmente (T0, T15, T30, T45, CMD). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016).

Variável mmHg	Momentos				
	T0	T15	T30	T45	CMD
<b>Doppler</b>	107,00 <sup>a</sup>	98,36 <sup>ab</sup>	90,14 <sup>b</sup>	89,58 <sup>b</sup>	93,53 <sup>b</sup>
<b>PAS</b>	138,40 <sup>a</sup>	129,61 <sup>ab</sup>	114,77 <sup>b</sup>	122,15 <sup>ab</sup>	123,49 <sup>ab</sup>
<b>PAD</b>	81,35 <sup>a</sup>	73,75 <sup>ab</sup>	65,70 <sup>b</sup>	71,44 <sup>ab</sup>	76,80 <sup>ab</sup>
<b>PAM</b>	101,93 <sup>a</sup>	94,72 <sup>ab</sup>	83,71 <sup>b</sup>	89,9 <sup>ab</sup>	93,30 <sup>ab</sup>

Onde: Doppler: pressão arterial sistólica medida por método Doppler; PAS: pressão sistólica medida por método oscilométrico; PAD: pressão diastólica medida por método oscilométrico; PAM: pressão arterial média medida por método oscilométrico

Teste de Tukey adotando-se nível de significância de 5%

Letras iguais significam que não houve diferença estatística entre os diferentes momentos

Números em vermelho indicam diferença estatística com o T0

Foram observadas quedas progressivas e significativas das pressões sistólica, diastólica e média durante o período de indução, sendo significativa em relação ao tempo zero da indução à partir dos 30 dias de aplicação da doxorubicina (T30), em ambos os métodos de mensuração.

### 3.6 Avaliação radiográfica do tórax

As radiografias torácicas dos coelhos foram obtidas nas projeções laterolateral direita e ventrodorsal. Os resultados estão apresentados na Tabela 6.

TABELA 6: Médias dos valores de VHS de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos e submetidos a tratamento com doxorubicina para indução de cardiomiopatia dilatada (CMD) e avaliados quinzenalmente (T0,T15, T30,T45, CMD). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016).

Variável	Momentos				
	T0	T15	T30	T45	CMD
<b>VHS</b>	8,30 <sup>a</sup>	8,07 <sup>b</sup>	8,34 <sup>a</sup>	8,26 <sup>ab</sup>	8,18 <sup>ab</sup>

Letras iguais correspondem a médias iguais dentro do mesmo tratamento, em momentos distintos:

Teste de Tukey, adotando-se nível de significância de 5%

Letras iguais significam que não houve diferença estatística entre os diferentes momentos

Números em vermelho indicam diferença estatística com o T0

Durante o período de indução foi observada diferença estatística no valor de VHS dos coelhos tratados com doxorubicina, entre os tempos 0 e 15 da avaliação. Foi possível observar aumento da silhueta cardíaca durante a análise qualitativa e quantitativa individual

das radiografias torácicas dos animais submetidos ao tratamento com doxorubicina, por meio do achado de desvio dorsal da traqueia, aumento do contato do coração com o esterno e valor de VHS (Figura 4). Observou-se presença de grande quantidade de gordura no mediastino cranial, obscurecendo a definição do bordo cranial da silhueta cardíaca (Figura 5).

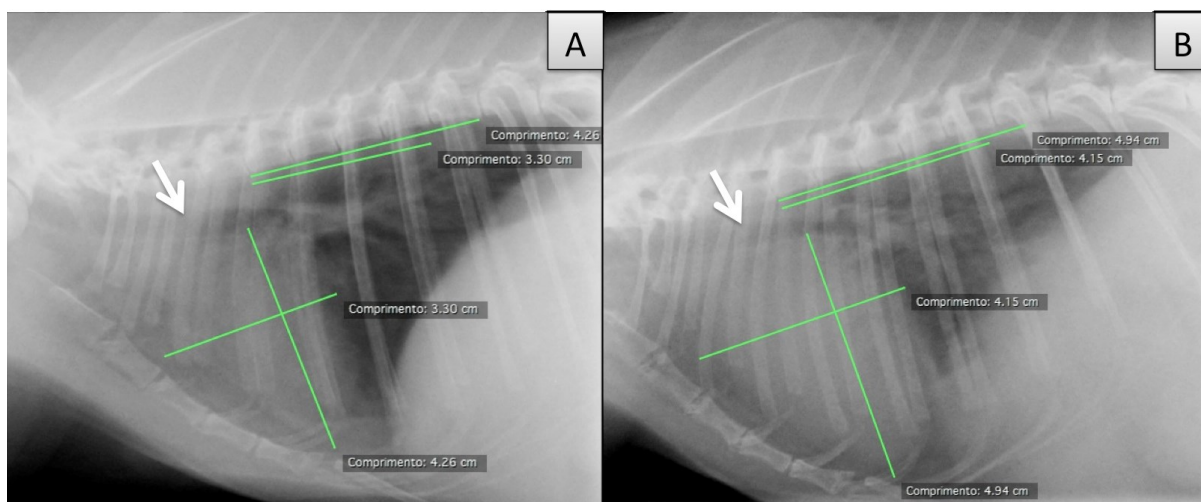


FIGURA 4: Radiografia em projeção laterolateral direita de coelho Nova Zelândia antes da indução da cardiomiopatia dilata (A) e após desenvolvimento da CMD (B), ilustrando os traçados para cálculo do VHS. VHS em A de oito vertebrae e em B de dez vértebras. Nota-se aumento da radiopacidade pulmonar em B, caracterizando padrão intersticial difuso, sugerindo edema pulmonar e deslocamento dorsal da traqueia em B (seta), devido a cardiomegalia generalizada.

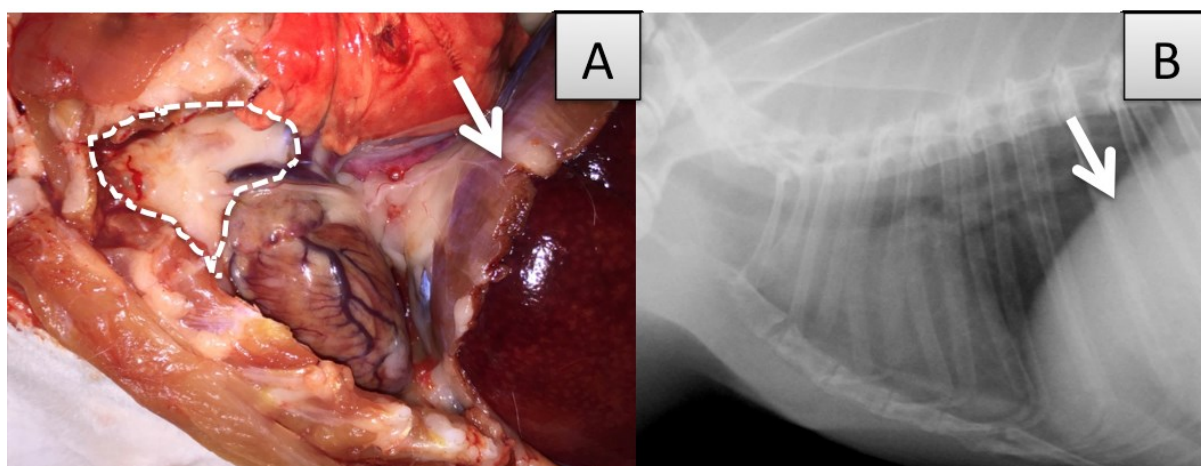


FIGURA 5: Espécime anatômico e imagem radiográfica torácica de coelho Nova Zelândia. Em A: Espécime anatômico identificando a gordura no mediastino (traçado) e diafragma (seta); B: Imagem radiográfica identificando o diafragma (seta). Observa-se pouca definição do limite cranial do coração, devido a gordura no mediastino cranial.

Em relação aos campos pulmonares, as principais alterações observadas nas projeções laterolateral direita e ventrodorsal foram a ocorrência de padrões pulmonares vascular e intersticial no decorrer de todo o tratamento (Figura 5). No momento T0 da indução, 100% dos coelhos apresentavam campos pulmonares limpos à radiografia. No

momento T15 o padrão vascular foi apresentado em 5,3% dos animais. No momento T30, 23% dos coelhos apresentavam padrão intersticial, já no momento T45, 15,38% apresentaram padrão intersticial, enquanto que o padrão vascular foi observado em 7,7% dos animais. No momento CMD, aos 60 dias de indução, 25% dos animais apresentavam padrão intersticial e 25% padrão vascular. Aos 75 dias, 30% dos coelhos apresentavam padrão vascular e 20% padrão intersticial. Aos 90 dias, 33,33% apresentavam padrão intersticial e outros 33,33% padrão vascular. E aos 105 dias de indução (n=2), 100% dos animais apresentavam padrão vascular à avaliação radiográfica.

### 3.7 Parâmetros bioquímicos e hematológicos

O procedimento de coleta das amostras de sangue transcorreu sem grandes dificuldades e em todos os momentos foi possível a obtenção de 5mL de amostra. Os dados da avaliação hematológica e bioquímica estão dispostos nas Tabelas 7, 8 e 9.

TABELA 7: Médias dos parâmetros hematológicos (eritrograma) de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos e submetidos a tratamento com doxorubicina para indução de cardiomiopatia dilatada (CMD) e avaliados quinzenalmente (T0,T15,T30,T45 e CMD). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016).

Variável	Momentos				
	0	15	30	45	CMD
<b>Hematócrito (%)</b>	45,28 <sup>a</sup>	36,02 <sup>b</sup>	35,11 <sup>b</sup>	40,09 <sup>c</sup>	42,06 <sup>c</sup>
<b>Hemácias (g/dL)</b>	6,49 <sup>a</sup>	5,28 <sup>cd</sup>	4,87 <sup>d</sup>	5,47 <sup>bc</sup>	5,88 <sup>b</sup>
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	14,51 <sup>a</sup>	11,49 <sup>bc</sup>	10,67 <sup>c</sup>	12,31 <sup>b</sup>	14,51 <sup>a</sup>
<b>VCM (tL)</b>	69,79 <sup>a</sup>	68,21 <sup>b</sup>	72,02 <sup>c</sup>	73,25 <sup>c</sup>	71,48 <sup>c</sup>
<b>HCM (g/dL)</b>	22,35 <sup>a</sup>	21,77 <sup>b</sup>	21,89 <sup>ab</sup>	22,49 <sup>ac</sup>	23,13 <sup>c</sup>
<b>CHCM (pg)</b>	32,03 <sup>a</sup>	31,91 <sup>a</sup>	30,39 <sup>b</sup>	30,69 <sup>b</sup>	32,38 <sup>a</sup>
<b>Plaquetas (giga/L)</b>	596,60 <sup>a</sup>	341,17 <sup>b</sup>	277,58 <sup>b</sup>	292,96 <sup>b</sup>	241,96 <sup>b</sup>

Onde: VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média

Teste de Tukey, adotando-se nível de significância de 5%

Letras iguais significam que não houve diferença estatística entre os diferentes momentos

Números em vermelho indicam diferença estatística com o T0

Os animais apresentaram redução significativa do hematócrito e das hemácias nos tempos T15 e T30 de avaliação, voltando a aumentar à partir do 45º dia de avaliação. Adjunto, foi observado aumento do volume corpuscular médio (VCM), a partir de T15, e queda da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) a partir do 30º dia. A hemoglobina corpuscular média (HCM) variou significativamente ao longo do tempo, apresentando queda no 15º dia e aumento no último momento de avaliação. O número de plaquetas também diminuiu significativamente à partir de T15 (Tabela 7).



O leucograma dos animais também apresentou variações significativas ao longo do período de indução. Os leucócitos totais reduziram a partir da segunda semana, acompanhado de queda no número de heterófilos, eosinófilos, linfócitos típicos e monócitos. Esses valores voltaram a subir a partir do 30º dia de avaliação (Tabela 8).

TABELA 8: Médias dos parâmetros hematológicos (leucograma) de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos e submetidos a tratamento com doxorubicina para indução de cardiomiopatia dilatada (CMD) e avaliados quinzenalmente (T0, T15, T30, T45, CMD). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016).

Variável	Momentos				
	0	15	30	45	CMD
<b>Leucócitos Totais (/mm<sup>3</sup>)</b>	4015,00 <sup>a</sup>	2004,47 <sup>b</sup>	3175,12 <sup>a</sup>	4167,42 <sup>a</sup>	3652,04 <sup>a</sup>
<b>Heterófilos (/mm<sup>3</sup>)</b>	1693,95 <sup>a</sup>	497,84 <sup>b</sup>	1128,34 <sup>ab</sup>	1832,93 <sup>a</sup>	1551,32 <sup>a</sup>
<b>Eosinófilos (/mm<sup>3</sup>)</b>	129,25 <sup>ab</sup>	56,82 <sup>b</sup>	125,69 <sup>ab</sup>	77,92 <sup>ab</sup>	186,15 <sup>a</sup>
<b>Linfócitos típicos (/mm<sup>3</sup>)</b>	1868,40 <sup>a</sup>	1300,82 <sup>b</sup>	1742,11 <sup>a</sup>	1849,49 <sup>a</sup>	1672,88 <sup>a</sup>
<b>Monócitos (/mm<sup>3</sup>)</b>	323,40 <sup>ab</sup>	146,08 <sup>c</sup>	178,20 <sup>c</sup>	386,20 <sup>a</sup>	240,8 <sup>bc</sup>

Teste de Tukey, adotando-se nível de significância de 5%

Letras iguais significam que não houve diferença estatística entre os diferentes momentos

Números em vermelho indicam diferença estatística com o T0

TABELA 9: Médias e erros padrão dos valores bioquímicos de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos e submetidos a tratamento com doxorubicina para indução de cardiomiopatia dilatada (CMD), durante 45 dias e avaliados quinzenalmente (T0, T15, T30, T45, CMD). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016).

Variável	Momentos				
	0	15	30	45	CMD
<b>Albumina (g/dL)</b>	4,52 <sup>a</sup>	3,98 <sup>b</sup>	3,81 <sup>b</sup>	3,62 <sup>b</sup>	2,27 <sup>c</sup>
<b>ALT (U/L)</b>	45,06 <sup>ab</sup>	40,55 <sup>bc</sup>	59,59 <sup>a</sup>	51,02 <sup>ab</sup>	25,50 <sup>c</sup>
<b>ALP (U/L)</b>	97,70 <sup>a</sup>	44,18 <sup>bc</sup>	54,00 <sup>b</sup>	42,35 <sup>bc</sup>	30,51 <sup>c</sup>
<b>Proteínas totais (g/dL)</b>	6,73 <sup>a</sup>	5,92 <sup>b</sup>	6,15 <sup>a</sup>	6,33 <sup>ab</sup>	4,30 <sup>c</sup>
<b>Uréia (mg/dL)</b>	33,99 <sup>ab</sup>	37,01 <sup>b</sup>	34,33 <sup>ab</sup>	30,35 <sup>a</sup>	31,78 <sup>a</sup>
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	1,30 <sup>ab</sup>	1,63 <sup>c</sup>	1,14 <sup>a</sup>	1,20 <sup>a</sup>	1,50 <sup>bc</sup>
<b>AST (U/L)</b>	48,76 <sup>a</sup>	34,30 <sup>b</sup>	32,29 <sup>b</sup>	37,12 <sup>ab</sup>	27,95 <sup>b</sup>
<b>LDH (U/L)</b>	577,6 <sup>a</sup>	262,1 <sup>b</sup>	483,2 <sup>ab</sup>	427,9 <sup>ab</sup>	348,7 <sup>ab</sup>
<b>CK (U/L)</b>	896,11 <sup>a</sup>	2013,88 <sup>b</sup>	1843,51 <sup>ab</sup>	1092,60 <sup>ab</sup>	2224,68 <sup>b</sup>
<b>CK<sub>MB</sub> (U/L)</b>	75,61 <sup>a</sup>	109,91 <sup>a</sup>	200,78 <sup>ab</sup>	414,14 <sup>c</sup>	319,83 <sup>bc</sup>
<b>Fósforo (mg/dL)</b>	4,24 <sup>a</sup>	4,48 <sup>a</sup>	3,05 <sup>b</sup>	3,97 <sup>a</sup>	2,69 <sup>b</sup>
<b>Potássio (mEq/L)</b>	3,97 <sup>a</sup>	4,70 <sup>b</sup>	6,68 <sup>c</sup>	4,47 <sup>ab</sup>	4,30 <sup>ab</sup>
<b>Cálcio (mg/dL)</b>	13,35 <sup>ab</sup>	12,28 <sup>c</sup>	13,57 <sup>ab</sup>	12,73 <sup>ac</sup>	14,04 <sup>b</sup>

Onde: ALT: alanina aminotransferase; ALP: fosfatase alcalina; AST: aspartato aminotransferase; LDH: lactato desidrogenase; CK: creatina quinase; CK<sub>mb</sub>: creatina quinase fração do miocárdio

Letras iguais significam que não houve diferença estatística entre os diferentes momentos

Números em vermelho indicam diferença estatística com o T0

Em relação às avaliações bioquímicas foi observada variação nas atividades das enzimas ALT, AST e ALP, com redução significativa no último momento de avaliação. A albumina diminuiu significativamente a partir de T15, acompanhada de redução na concentração de proteínas totais no momento CMD. Foi observado aumento significativo creatinina no momento T15. A creatinaquinase aumentou ao longo do tempo, sendo significativamente maior que os valores basais ao 15º dia de indução e no momento em que todos os animais apresentavam disfunção sistólica (CMD). A CK<sub>MB</sub> aumentou significativamente a partir do tempo T45. Os eletrólitos dosados variaram ao longo do tempo, observando diminuição significativa do fósforo a partir do 30º dia e aumento do potássio nos momentos T15 e T30. Observou-se redução do cálcio no momento T15 e aumento no momento CMD (Tabela 9).

#### 4. DISCUSSÃO

A taxa de mortalidade durante o período de indução da cardiomiopatia dilatada por doxorubicina foi de 35%, próxima à taxa de 30% obtida no estudo de Gava et al.<sup>9</sup>. No entanto, no referido estudo, essa taxa foi alcançada no 60º dia de avaliação, fato que alicerçou a decisão de mudar o protocolo no decorrer do presente estudo, visto que antes do 30º dia foi alcançada a taxa de 35% de mortalidade. A partir do 30º dia, a dose de 1mg/Kg foi mantida, entretanto as aplicações passaram a ser semanais e não duas vezes durante a semana e, a partir desse ponto, não houve mais óbitos.

Outros pesquisadores tentaram replicar um dos protocolos utilizados no estudo de Gava et al.<sup>9</sup>, qual seja, aplicações semanais de 2mg/Kg de doxorubicina durante oito semanas, enquanto Gava et al.<sup>9</sup> o fizeram por seis semanas. Utilizando esse protocolo, Gava et al.<sup>9</sup> obtiveram taxa de mortalidade de 70%, enquanto Talavera et al.<sup>10</sup>, atingiram taxa de mortalidade de 50%, entre a terceira e sétima semana do protocolo de indução. Essa observação de distintas taxas de mortalidade, utilizando um mesmo protocolo, levanta a questão de que a sensibilidade à doxorubicina, produzindo cardiotoxicidade, seja diferente entre animais de uma mesma espécie.

As alterações observadas à avaliação macroscópica dos animais que morreram eram multissistêmicas, porém em comum todos apresentavam alterações gastrointestinais, incluindo hemorragia focal e úlceras. Esses efeitos tóxicos gastrointestinais são apontados como ponto negativo do modelo de CMD induzida pela doxorubicina<sup>6</sup>. Em humanos, foi relatado que alguns pacientes apresentam alterações gastrointestinais, principalmente nas

fases iniciais do tratamento quimioterápico com doxorubicina, entre o quinto e décimo dia, porém a maioria se recupera e, nos casos severos, podem haver ulcerações e necrose, causando infecções no cólon e ceco, que podem ser fatais<sup>23</sup>, como ocorrera em alguns dos coelhos deste estudo.

Embora tenham sido encontradas alterações microscópicas no coração dos coelhos que morreram durante a indução da CMD e que podem ser imputadas a ação da doxorubicina, considerou-se que a morte dos animais se deu em decorrência dos efeitos tóxicos multissistêmicos do fármaco, especialmente aqueles relacionados aos sistemas digestório e circulatório, que culminaram em quadros hemorrágicos fatais. Como relatado anteriormente, a doxorubicina apresenta efeitos tóxicos gastrointestinais<sup>6</sup>, que associados à trombocitopenia observada, pode ter contribuído para a ocorrência dos quadros hemorrágicos.

Na avaliação eletrocardiográfica, constatou-se aumento da duração dos complexos QRS a partir do momento T30. Isso sugere sobrecarga nas câmaras ventriculares e distúrbios de condução, compatíveis com a esperada dilatação ventricular. A amplitude da onda P diminuiu no momento T30, voltando aos mesmos níveis (momento T0 e T15) no momento T45. Essa diminuição de amplitude não tem significado clínico, uma vez que se espera um aumento da amplitude nos casos de CMD e os valores mantiveram-se dentro da normalidade para a espécie<sup>13,25,26</sup>.

A duração do intervalo do segmento Q-T, durante a indução, apresentou aumento a partir do momento T15, atingindo seu pico no momento T30, e regredindo discretamente no momento T45. Tal achado pode ser explicado pela diminuição da frequência cardíaca nos respectivos momentos. A diminuição da frequência cardíaca é esperada no decorrer do estudo e explica-se devido à aclimatação dos animais à manipulação durante as avaliações. A taquicardia sinusal, observada nos momentos T0 e T15 da indução, pode ser explicada pela facilidade da espécie se estressar durante a manipulação, o que pode resultar em interpretações equivocadas. Já as alterações na onda T são achados comuns com uso de doxorubicina<sup>25,27</sup>.

Os valores de eixo elétrico cardíaco médio permaneceram dentro da normalidade preconizada para a espécie, porém observou-se alta variabilidade nos resultados, obtendo-se elevado erro padrão na variável analisada. A alta variação do eixo pode ser explicada pelo formato peculiar do tórax desses animais, e pelo fato de permanecerem em decúbito esternal, que difere dos métodos normais de obtenção de eixo elétrico médio cardíaco, que é em decúbito lateral direito<sup>13</sup>.

À semelhança do que acontece em pacientes portadores de cardiomiopatia dilatada primária<sup>28</sup>, foi observada a ocorrência de complexos ventriculares prematuros, alteração não apresentada pelos animais que compuseram os estudos de Gava<sup>25</sup> e Rosa<sup>29</sup>, que também avaliaram os animais por meio de eletrocardiograma ambulatorial, porém no presente experimento não foi observada taquicardia ventricular. Entretanto, um estudo realizado por Wess et al.<sup>30</sup> mostrou que eletrocardiografias de cinco minutos não têm boa eficácia para identificar eventos arrítmicos, sendo o método realizado por Holter, em 24 horas, mais confiável em cães com CMD. Porém, este estudo foi realizado em coelhos e a monitorização com o Holter poderia representar um fator de estresse para a espécie.

Assim como observado neste estudo, outro grupo de pesquisadores, ao empregar o modelo leporino de CMD induzida por doxorubicina, observou que os índices de reentrada de impulso elétrico e a arritmia ventricular foram mais altos nos grupos tratados com essa antraciclina. Com bases nesses achados, levantaram a hipótese de que o mecanismo antioxidativo do miocárdio dos animais estava comprometido, frente ao aumento dos radicais livres, mediado pela administração desta antraciclina, que possivelmente mediou a saída do cálcio do retículo sarcoplasmático, aumentando o cálcio citoplasmático, o que predispõe à ocorrência de arritmias ventriculares<sup>31</sup>.

A dilatação cardíaca esperada no desenvolvimento da CMD foi observada a partir do 30º dia de indução, sendo demonstrada por meio da avaliação ecocardiográfica em modo M e bidimensional, observando-se aumento das dimensões internas do ventrículo esquerdo em sístole e diástole, e diminuição da espessura das paredes livres do VE e do septo interventricular. Nesse mesmo momento, também verificou-se diminuição dos índices de função sistólica do VE, porém ainda encontravam-se dentro dos valores normais reportados para a espécie<sup>13</sup>. A disfunção sistólica foi alcançada com diferentes doses cumulativas entre os animais experimentais e, ao contrário do observado por Gava et al.<sup>9</sup>, a média da fração de encurtamento do grupo ainda estava acima do valor mínimo da espécie aos 45 dias da indução<sup>13</sup>, mais uma vez indicando que em um grupo de animais da mesma espécie a sensibilidade à doxorubicina é individual.

A avaliação dos fluxos transvalvares não apresentou variações significativas em relação ao fluxo aórtico. Houve variações significativas nas velocidades da onda E do fluxo tricúspide e da velocidade máxima do fluxo pulmonar, porém os valores mantiveram-se dentro dos reportados como normais para a espécie. Já por meio da avaliação do fluxo da válvula mitral, observou-se inversão da relação E/A no momento em que todos os animais apresentaram disfunção sistólica. Ainda, observou-se aumento do tempo de relaxamento

isovolumétrico do ventrículo esquerdo, porém sem diferença, a partir do 45º dia de indução, estando o valor obtido acima do reportado em coelhos o que, associado à inversão da relação E/A, configura disfunção diastólica<sup>13,15</sup>.

A avaliação Doppler tecidual por sua vez, indicou disfunção diastólica da parede livre no VE a partir do 45º dia em corte apical e do 15º dia em corte transversal, à semelhança do reportado por Gava et al.<sup>32</sup>. Nesses momentos foi observada inversão da relação E'/A', aumento da relação E/E' e diminuição da velocidade da onda E', com valores distintos dos relatados em coelhos saudáveis<sup>18</sup>, o que configura a disfunção diastólica anterior à sistólica nesses animais. A disfunção diastólica também precede a sistólica em cães portadores de CMD de ocorrência natural<sup>33</sup>.

A pressão arterial sistólica dos animais diminuiu ao longo do estudo, porém manteve-se dentro do valor normal para a espécie, qual seja 70-170mmHg<sup>34</sup>. A queda das pressões sistólica, diastólica e média foi significativa quando comparada ao tempo zero, a partir do 30º dia de indução, mesmo momento em que observou-se redução das frações de encurtamento e ejeção do ventrículo esquerdo, ou seja, redução da função sistólica do miocárdio. Sabe-se que o comprometimento funcional do miocárdio leva a redução do débito cardíaco e consequentemente da pressão arterial sistêmica e que esses mecanismos fazem parte do desenvolvimento do quadro de insuficiência cardíaca<sup>35</sup>, que é a via final da cardiotoxicidade da doxorrubicina.

Os valores de VHS, calculados por meio da avaliação das radiografias torácicas dos animais, no início da indução e no decorrer do estudo, mostraram-se semelhantes aos relatados em outros estudos realizados em coelhos saudáveis e também naqueles submetidos à indução de CMD por doxorrubicina<sup>25,29,36</sup>. Contudo, a avaliação radiográfica dos animais revelou uma cavidade torácica pequena em comparação com o tamanho do tronco, o que, juntamente com o fato de que os coelhos apresentam quantidade considerável de gordura no mediastino cranial, pode ter comprometido o cálculo do valor do VHS na espécie<sup>12,13</sup>. Como resultado, a interpretação das alterações cardíacas e pulmonares foi um desafio.

Em relação aos pulmões, as principais alterações observadas nas projeções laterolateral direita e ventrodorsal foram a ocorrência de padrões pulmonares vasculares e intersticiais difusos no decorrer de todo o tratamento, iniciando com padrão vascular ao 15º dia de indução. Ainda não há relatos a respeito dos padrões pulmonares em animais dessa espécie quando submetidos à indução da cardiomiopatia dilatada por doxorrubicina. Entretanto, sabe-se que a cardiomiopatia dilatada, independente da etiologia, pode produzir quadros de insuficiência cardíaca congestiva<sup>35</sup>, que incluem alterações pulmonares dessa

natureza devido ao edema. Vale ressaltar a dificuldade de obtenção de imagens em inspiração completa<sup>12</sup>.

Os valores eritrocitários dos coelhos estavam dentro da normalidade para a espécie na avaliação realizada no tempo zero, porém o mesmo não ocorreu em relação ao leucograma, visto que os animais apresentavam leucopenia em T0. Na espécie leporina, a leucopenia pode ser atribuída a estágios de estresse crônico<sup>37</sup>, o qual é esperado que ocorra em condições experimentais, já que aos animais são mantidos em cativeiro e manipulados constantemente. Apesar da leucopenia observada no momento zero, a relação heterófilos:linfócitos foi de 42:46, o que é considerado normal para a faixa etária dos animais do presente estudo<sup>38</sup>.

Suspeita-se que os animais do presente estudo desenvolveram mielossupressão, pois os valores de hemácias, leucócitos totais e plaquetas reduziram abaixo do mínimo reportado para a espécie<sup>37</sup> no 30º dia da indução, ao contrário dos resultados obtidos por Rosa<sup>29</sup>, que não observou redução dos valores hematimétricos. Outros estudos empregando coelhos também reportaram a ocorrência de anemia, trombocitopenia e leucopenia<sup>8,10</sup>. A depressão da medula óssea induzida pela doxorrubicina é outro ponto negativo desse modelo experimental de CMD<sup>6</sup>. Porém, percebeu-se que, após a alteração do protocolo de indução no 30º dia, houve aumento dos valores hematimétricos dos animais, e esses não mais apresentavam anemia quando desenvolveram a CMD, porém ainda estavam com trombocitopenia e leucopenia<sup>37</sup>.

Em relação aos parâmetros bioquímicos, não foram observadas alterações das enzimas ALT, ALP e AST que pudessem sugerir lesão hepática<sup>39,40</sup>, assim como reportado em outros estudos empregando o modelo leporino de CMD induzida por doxorrubicina<sup>8,10,29</sup>. A creatinina aumentou significativamente no 15º dia e no momento em que os animais desenvolveram CMD e também foi observado aumento da ureia, neste momento, mas com valores dentro da normalidade<sup>40</sup>.

Os coelhos, ao contrário dos humanos, podem desenvolver lesões glomerulares quando expostos a doxorrubicina<sup>8,10,41</sup>. Essa particularidade da espécie explica as alterações encontradas na concentração de ureia e creatinina dos animais do presente estudo. Outro achado que corrobora para a conclusão de que esses animais tiveram lesão renal é a diminuição da albumina circulante, o que pode ser relacionado a lesão da lâmina basal do glomérulo, comprometendo a reabsorção das proteínas, pelo epitélio danificado dos túbulos contorcidos. Essa hipoalbuminemia foi reportada em outro estudo, com doxorrubicina,

empregando coelhos<sup>8</sup>. Assim, é possível sugerir que neste estudo o protocolo de indução da CMD promoveu nefrotoxicidade.

Os eletrólitos cálcio e potássio, que poderiam ser outro indicativo de lesão renal, mantiveram-se dentro dos valores normais da espécie. O fósforo diminuiu ao longo do tempo, e a média da concentração desse eletrólito estava abaixo no mínimo no momento em que os animais desenvolveram CMD. Em lagomorfos a hipofosfatemia pode estar associada a redução da absorção gastrointestinal<sup>40</sup>, o que pode ter ocorrido nesses animais uma vez que apresentaram sinais de toxicidade gastrointestinal à ação da doxorubicina.

As enzimas LDH, CK e CK-MB foram utilizadas como biomarcadores de lesão cardíaca. A enzima LDH estava acima do valor normal da espécie desde o tempo zero, apresentando oscilações ao longo do estudo. A LDH está presente em várias células do corpo, incluindo as hemácias e, portanto, a hemólise que pode ocorrer durante a coleta, colabora para o achado de valores elevados. Outra característica que torna a enzima um biomarcador ruim para avaliação de lesão cardíaca na espécie leporina é a falta de *kits* específicos para a dosagem dessa enzima na veterinária<sup>39</sup>.

A creatinaquinase e a cretinaquinase fração do miocárdio também aumentaram ao longo do estudo. Existem distintos valores de referência reportados para a concentração da enzima CK no sangue de coelhos, e os valores reportados variam de 58,6 a 1000 UI/L<sup>39,42</sup>. Considerando o valor máximo proposto por Jenkins<sup>39</sup> (175,0 UI/L) a CK dos animais já se encontrava acima do valor de referência desde o tempo zero do protocolo de indução. O que pode ter contribuído para esse achado é o fato dessa enzima estar presente em células da musculatura esquelética e não somente no miocárdio, o que faz com que essa enzima se eleve devido a contenção física a que esses animais são submetidos para a coleta de sangue<sup>40,42</sup>. Assim, pode-se concluir que a CK e LDH não são bons biomarcadores de lesão cardíaca nessa espécie.

A CK<sub>MB</sub> por outro lado, apresentou-se dentro da normalidade<sup>43</sup> no tempo zero da indução. A partir do tempo T15, observou-se aumento gradual dessa enzima, obtendo-se valor máximo no tempo de 45 dias, mesmo momento em que os animais começaram a desenvolver disfunção sistólica. No momento T30, a CK<sub>MB</sub> apresentou aumento de 37,6% em relação ao valor basal, o que coincidiu com o momento em que houve redução significativa da FS% obtida na avaliação ecocardiográfica. Esse resultado demonstra que, assim como ressaltado em outro estudo<sup>44</sup>, a avaliação ecocardiográfica é uma excelente ferramenta para acesso não invasivo da disfunção ventricular em protocolos experimentais, utilizando o modelo de CMD induzida por doxorubicina, apresentando alterações correspondentes ao dano estrutural

celular. Ajmal et al.<sup>43</sup>, utilizando modelo de indução de CMD em coelhos, também observaram aumento da CK<sub>MB</sub>, dez dias após aplicação de dose única de 12 mg/Kg de doxorubicina, acompanhando o aumento da concentração da troponina I, outro biomarcador de lesão cardíaca.

## 5. CONCLUSÕES

Conclui-se que o modelo leporino de CMD induzida por doxorubicina é um bom modelo para o estudo da doença e suas consequências, induzindo disfunção sistólica e diastólica do miocárdico e dilatação do ventrículo esquerdo. Ainda induz ao quadro de insuficiência cardíaca congestiva, com imagem radiográfica compatível com edema pulmonar.

O modelo apresenta alguns pontos negativos, como a resposta individual à cardiotoxicidade, o que faz com que o tempo para indução da CMD seja inexato. Outrossim, a ocorrência de sinais de toxicidade multissistêmica, como a mielossupressão e nefrotoxicidade, contribuem para a elevada taxa de mortalidade.

Ainda, apresenta, vários pontos positivos: são animais pequenos e de fácil acomodação e contenção; o peso corpóreo é ideal para a obtenção e reprodução de imagens ecodopplercardiográficas, viabilizando a obtenção de informações hemodinâmicas de forma não invasiva; a coleta de volumes maiores de amostras de sangue é factível e o acesso venoso ocorre sem grandes complicações.



## REFERÊNCIAS

1. Sanbe A. Cardiomyopathy: a disease of the myocardium. *Biol. Pharm. Bull.* 2013;36(1):18-22.
2. Sisakian, H. Cardiomyopathies: evolution of pathogenesis concepts and potencial for new therapies. *Word J Cariol* 2014 June; 6(6): 478-494.
3. Nonaka M, Morimoto S, Murayama T, Kurebayashi N, Li L, Wang Y, Arioka M, Yoshihara T, Takahashi-Yanaga F, Sasaguri T. Stage-dependent benefits and risks of pimobendan in genetic dilated cardiomyopathy mice with progressive heart failure. *Br J Pharmacol* 2015; 172(9):2369-82.
4. Simpson S, Edwards J, Ferguson-Mignan TFN, Cobb M, Mongan NP, Rutland C. Genetics of human and canine dilated cardiomyopathy. *Int J Genomics.* 2015: 13 pages.
5. Recchia FA, Lionetti V. Animal models of dilated cardiomyopathy for translational research. *Vet Res Commun* 2007; 31(suppl.1):35-41.
6. Houser SR, Margulies KB, Murphy AM, Spinale FG, Francis GS, Prabhu SD, Rockman HA, Kass DA, Molkentin JD, Sussman MA, Koch WJ. Animal models of heart failure: a scientific statement from the american heart association. *Circ Res* 2012; 111:131-150.
7. Pogwizd SM, Bers DM. Rabbit models of heart disease. *Drug Discov Today Dis Models* 2008; 5(3):185-193.
8. Klimtová I, Simunek T, Mazurová Y, Hrdina R, Gersl V, Adamcová M. Comparative study of chronic toxic effects of daunorubicin and doxorubicin in rabbits. *Hum Exp Toxicol* 2002, 21:649-657.
9. Gava FN, Zacché E, Ortiz EMG, Champion T, Bandarra MB, Vasconcelos RO, Barbosa JC, Camacho AA. Doxorubicin induced dilated cardiomyopathy in a rabbit model: An update. *Res Vet Sci* 2013; 94:115-121.
10. Talavera J, Giraldo A, Fernandez-Del-Palacio MJ, Garcia-Nicolas O, Seva J, Brooks G, Moraleda JM. An upgrade on the rabbit model of anthracycline-induced cardiomyopathy: shorter protocol, reduced mortality, and higher incidence of overt dilated cardiomyopathy. *Biomed Res Int* 2015; 2015:13p.
11. Tilley LP. *Essentials of canine and feline eletrocardiography.* 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger 1992, 470p.
12. Pariaut R. Cardiovascular physiology and diseases of the rabbit. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* 2009; 12:135-144.
13. Giannico AT, Garcia DAA, Lima L, Lara FA, Ponczek CAC, Shaw GC, Montiani-Ferreira F, Froes TR. Determination of normal echocardiographic, electrocardiographic, and radiographic cardiac parameters in conscious New Zeland White rabbit. *J Exot Pet Med* 2015; 24:223-234.

14. Bonagura JD, Fuentes VL. Ecocardiography In: Mattoon JS, Nyland TG. Small animal diagnostic ultrasound. 3 ed. Saint Louis: Elsevier; 2015, p.217-331.
15. Boon JA. Veterinary echocardiography. 2 ed. West Sussex: Wiley Blackwell; 2011, 632p.
16. Thomas WP, Garber CE, Jacobs GJ. Recommendations for standards in transthoracic two-dimensional echocardiography in the dog and cat. The echocardiography Committee of the Specialty of Cardiology, American College of Veterinary Internal Medicine. J Vet Intern Med 1993; 7(4):247-252.
17. Stypmann J, Engelen MA, Breithardt AK, et al: Doppler echocardiography and tissue Doppler imaging in the healthy rabbit: differences of cardiac function during awake and anaesthetised examination. Int J Cardiol 2007; 115: 164-170.
18. Casamian-Sorrosal D, Saunders R, Browne WJ, Elliott S, Fonfara S. M-mode, two-dimensional and Doppler echocardiographic findings in 40 healthy domestic pet rabbits. J Vet Cardiol 2014; 16:101-108.
19. Henik RA, Dolson MK, Wenholtz LJ. How to obtain a blood pressure measurement. Clin Tech Small Anim Pract 2005; 20(3):144-150.
20. Brown S, Atkins C, Bagley R, Carr A, Cowgill L, Davidson M, Egner B, Elliott J, Henik R, Labato M, Littman M, Polzin D, Ross L, Snyder P, Stepien R. Guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. J Vet Intern Med 2007; 21:542-558.
21. Buchanan J, Bücheler J. Vertebral scale system to measure canine heart size in radiographs. J Am Vet Med Assoc 1995; 206(2):194-199.
22. Thrall DE. Diagnóstico de radiologia veterinária. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.
23. Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. J Pharm Pharmacol 2012, 65:157-170.
24. Takemura G, Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to manegement. Prog Cardiovasc Dis 2007; 49(5):330-52.
25. Gava FN. Indução da cardiomiopatia dilatada com doxorubicina em modelo experimental com coelhos. [Dissertação]. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias; 2011.
26. Pedro BM, Alves JV, Cripps PJ, Johnson MJS, Martin MWS. Association of QRS duration and survival in dogs with dilated cardiomyopathy: A retrospective study of 266 clinical cases. J Vet Cardiol 2011; 13:243-249.
27. Pereira-Neto GB, Andrade JNB, Sousa MG, Camacho AA. Holter electrocardiography in dogs showing doxorubicin-induced dilated cardiomyopathy. Arq Bras Med Vet Zootec 2006; 58(6):1037-1042.

28. Dukes-McEwan J, Borgarelli M, Tidholm A, Vollmar AC, Haggstrom J. Proposed guidelines for the diagnosis of canine idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Vet Cardiol.* 2003;5(2):7-19.
29. Rosa FA. Avaliação dos efeitos do carvedilol, ciclosporina A e citrato de sildenafil sobre a cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina em modelo experimental com coelhos. [Tese]. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias; 2016.
30. Wess G, Schulze A, Geraghty N, Hartmann K. Ability of a 5-minute electrocardiography (ECG) for predicting arrhythmias in Doberman Pinschers with cardiomyopathy in comparison with a 24-hour ambulatory ECG. *J Vet Intern Med* 2010; 24:367-371.
31. He L, Xiao J, Fu H, Du G, Xiao X, Zhang C, Gu Y, Ma Y. Effect of oxidative stress on ventricular arrhythmia in rabbits with adriamycin-induced cardiomyopathy. *J Huazhong Univ Sci Technol [Med Sci]* 2012; 32(3):334-339.
32. Gava FN, Nogueira SSS, Rosa FA, Ortiz EMG, Zacché E, Camacho RR, Canola JC, Camacho AA. Tissue Doppler evaluation in non-sedated rabbits during doxorubicin treatment. *J Vet Intern Med* 2013; 27:604-756.
33. O'sullivan ML, O'grady MR, Minors SL. Assessment of diastolic function by doppler echocardiography in normal Doberman pinschers and Doberman pinschers with dilated cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 2007; 21:81-91.
34. Dominguez R. The systolic blood pressure of the normal rabbit measured by a slightly modified van lerrsum method. *J Exp Med.* 1927, 46(3):443-461.
35. Ware WA. Cardiovascular disease in small animal medicine. London: Manson Publishing Ltd; 2011. 396p.
36. Onuma M, Ono S, Ishida T, Shibuya H, Sato T. Radiographic measurement of cardiac size in 27 rabbits. *J Vet Med* 2010, 72 (4):529-531.
37. Moore DM, Zimmerman K, Smith SA. Hematological assessment in pet rabbits: blood sample collection and blood cell identification. *Clin Lab Med* 2015, 35:617-627.
38. Campbell TW. Mammalian hematology: laboratory animals and miscellaneous species. In: Thrall MA, Weiser G, Alisson RW, Campbel TW. *Veterinary hematology and clinical chemistry.* 2<sup>nd</sup> ed. Iowa:Wiley-Blackwell; 2012. p.225-237.
39. Jenkins JR. Rabbit Diagnostic Testing. *J Exot Pet Med* 2008, 17(1):4-15.
40. Melillo A. Rabbit Clinical Pathology. *J Exot Pet Med* 2007, 16(3):135-145.
41. Long HJ, Diamond SS, Raflo CP, Burningham RA. Dose-response relationships of chronic adriamycin toxicity in rabbits. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1984, 1:129-135.

42. Washington IM, Van Hossier G. Clinical biochemistry and hematology. In: Suckow MA, Stevens KA, Wilson RP. The laboratory rabbit, guinea pig, hamster, and other rodents. London:Elsevier; 2012. p. 57-116.
43. Ajmal K, Khan BT, Hashim R, Bakhtiar S. Early detection of doxorubicin-induced cardiotoxicity and its prevention by  $\alpha$ -tocopherol. Pak Armed Forces Med 2014, 64(3):384-90.
44. Bertinchant JP, Polge A, Juan JM, Oliva-Lauraire MC, Giuliani I, Marty-Double C, Burdy JY, Fabbro-Peray P, Laprade M, Bali JP, Granier C, Coussaye JE, Dauzat M. Evaluation of cardiac troponin I and T levels as markers of myocardial damage in doxorubicin-induced cardiomyopathy rats, and their relationship with echocardiographic and histological findings. Clinica Chimica Acta 2003, 329:39-51.

## **CAPÍTULO 3 – AÇÃO DO LASSBIO 294 SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR DE COELHOS COM CARDIOMIOPATIA DILATADA EXPERIMENTALMENTE INDUZIDA POR DOXORUBICINA**

### **LASSBIO 294 ACTION ON THE CARDIOVASCULAR SYSTEM OF RABBITS WITH DILATED CARDIOMYOPATHY EXPERIMENTALLY INDUCED BY DOXORUBICIN**

#### **RESUMO**

A insuficiência cardíaca (IC) é a síndrome cardiovascular mais emergente no mundo e uma das causas dessa manifestação é a cardiomiopatia dilatada. Porém, o aumento do número de casos de IC não foi acompanhado da redução da taxa de mortalidade da enfermidade o que torna imperativo a descoberta de novos tratamentos. Frente a essa necessidade um candidato a fármaco inodilatador foi desenvolvido, sintetizado do óleo de sassafrás, denominado LASSBio 294, com ação observada em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Neste estudo, propôs-se verificar a ação do composto em coelhos com CMD induzida por doxorubicina e comparar com a ação da pimobendana. Para tanto foram utilizados treze coelhos Nova Zelândia, alocados aleatoriamente nos dois tratamentos propostos após o desenvolvimento da CMD, sendo tratados durante 30 dias e acompanhados semanalmente por meio de exames clínico, eletrocardiográfico, ecodopplercardiográfico, mensuração da pressão arterial, radiografia torácica, dosagem de biomarcadores de lesão cardíaca, e de função renal e hepática e avaliação hematológica. Conclui-se que o LASSBio 294 foi eficiente em incrementar a função sistólica e melhorar a função diastólica dos coelhos, sem alterar a pressão arterial e reduzir a concentração sérica de creatinina. Adjunto, não apresenta efeitos pro arritmogênicos ou efeitos tóxicos. No entanto, não impediu a evolução do quadro congestivo.

Palavras-chave: cardiopatia, leporino, inodilatador

#### **ABSTRACT**

Heart failure (HF) is the most emerging cardiovascular syndrome in the world and one of the causes of this condition is dilated cardiomyopathy. However, the increasing number of HF cases was not accompanied by reduction of mortality of the disease which makes it imperative to find new treatments. In view of this need an inodilator a drug candidate was developed, synthesized from sassafras oil, called LASSBio 294, with proven effects in *in vitro* and *in vivo* assays. In this study, the action of this compound was evaluated in rabbits with DCM induced by doxorubicin and compared with the action of pimobendan. Therefore, 20 New Zealand rabbits were used, and randomly allocated in the two proposed treatments after development of DCM, being treated for 30 days and weekly accompanied by electrocardiography, echodopplercardiography, measurement of blood pressure, chest radiograph, dosage of cardiac lesions, and kidney and liver functions biomarkers and hematologic evaluation. It was concluded that LASSBio 294 increases the systolic function and improves diastolic function of rabbits, without altering blood pressure and reduces the serum creatinine concentration. Furthermore, it has no pro-arrhythmogenic or toxic effects. However, it did not prevent the congestive course.

Keywords: heart disease, leporine, inodilator

## 1. INTRODUÇÃO

Estima-se que a insuficiência cardíaca (IC) acometa mais de 37,7 milhões de pessoas em todo o mundo. Em um levantamento que analisou as publicações dos últimos sessenta anos dos Arquivos Brasileiros de Cardiologia, a síndrome IC foi a condição cardiovascular mais prevalente a partir do início do século 21, mantendo-se em primeiro lugar até 2013, data limite do levantamento de dados do estudo. Isso se deve principalmente a melhora do sistema de saúde de países desenvolvidos e em desenvolvimento, o que colaborou para a longevidade da população e, conseqüentemente, para o aumento da prevalência das doenças crônicas<sup>1,2</sup>.

Frente à necessidade de novos fármacos para tratamento da IC, um novo protótipo a fármaco capaz de promover efeitos vasodilatadores e inotrópicos positivos combinados, o LASSBio 294, foi desenvolvido pelo Laboratório de Avaliação de Substâncias Bioativas (LASSBio), da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

O LASSBio 294, derivado *N*-acilidrazônico (NAH), embora fruto da modelagem molecular, foi elaborado a partir do substrato de safrol, um composto extraído do óleo de sassafrás, encontrado em plantas como a canela-branca (*Ocotea pretiosa*)<sup>3</sup>. Os efeitos vasodilatadores e inotrópicos positivos foram comprovados em bioensaios, utilizando anéis isolados e intactos de aorta, e em corações inteiros e frações de miocárdio de ratos. Estes resultados sugerem que o mecanismo de ação, quanto aos seus efeitos vasodilatadores, pode estar relacionado com a inibição de fosfodiesterases (PDEs), assim como o efeito inotrópico está relacionado ao aumento da captação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo retículo sarcoplasmático<sup>3-5</sup>.

Em ratos com infarto miocárdico experimentalmente induzido, o LASSBio 294 foi capaz de reduzir o remodelamento induzido pelo quadro isquêmico, diminuindo o volume de colágeno depositado e os infiltrados, indicando ação no sistema imune dos animais tratados, suspostamente regulando mediadores da inflamação. Adicionalmente foi detectado aumento do lusitropismo cardíaco, com diminuição da pressão de enchimento do ventrículo esquerdo no grupo tratado, e esse mecanismo foi associado a modulação da ação da proteína SERCA, que aumenta a captação do  $\text{Ca}^{2+}$ , pelo retículo sarcoplasmático, induzindo ao relaxamento miocárdico e melhorando a função diastólica<sup>6</sup>.

Face ao atraente perfil farmacológico identificado para esse autêntico protótipo a fármaco cardioativo (LASSBio 294) identificado em estudos *in vitro*<sup>3-5</sup>, estudos *in vivo* pré-clínicos<sup>6,7</sup> foram conduzidos para identificar a ação deste sobre os parâmetros cardiovasculares de cães da raça Beagle. Foi observada diminuição da pressão arterial, com

pico mínimo após quatro horas da administração, e incremento da função sistólica, com pico máximo após 24 horas da administração do protótipo, quando os animais receberam 2mg/kg, sem sinais de hipotensão ou efeitos adversos, demonstrando o potencial terapêutico da molécula. Diferente dos bioensaios, não foi identificado efeito dose dependente em cães, sendo os melhores resultados obtidos com a dose de 2mg/kg<sup>6</sup>.

O estudo pré-clínico foi realizado em cães saudáveis, sendo consequentemente de fundamental importância a realização de ensaios em animais com doença cardíaca, em que o comprometimento do inotropismo do miocárdio faça parte de sua etiopatogenia, como exemplo a cardiomiopatia dilatada, para, dessa forma, comprovar a eficiência do LASSBio 294 no incremento à performance miocárdica desses animais<sup>6</sup>. O composto foi testado em ratos com infarto do miocárdio experimentalmente induzido, com bons resultados<sup>8</sup>. Porém, diferenças estruturais e fisiológicas entre os roedores e humanos fazem com que seja necessário que todo novo fármaco testado, o seja também em uma espécie mamífera não roedora, a exemplo os coelhos<sup>9</sup>.

Diante do exposto, propôs-se verificar a ação do protótipo a fármaco LASSBio 294 sobre os parâmetros cardiovasculares de coelhos com cardiomiopatia dilatada experimentalmente induzida por doxorrubicina, utilizando como controle positivo o tratamento com pimobendana, fármaco inotrópico positivo e vasodilatador já utilizado com sucesso na terapêutica de cães com CMD. Esperou-se contribuir potencialmente para a ascensão do LASSBio 294 a fármaco, podendo este ser utilizado no tratamento de humanos e animais, enriquecendo os protocolos existentes para tratamento da CMD e, consequentemente, de outras enfermidades cardíacas cuja via final seja a insuficiência cardíaca.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

Este estudo obedeceu aos preceitos da Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório, tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFG sob o protocolo número 006/14.

Previamente ao experimento que avaliaria a ação do LASSBio 294 em coelhos com CMD foi realizado um experimento utilizando dois coelhos adultos, hípidos, da raça Nova Zelândia, para identificar os metabólitos gerados após a administração do LASSBio 294, por meio de amostras de sangue, submetidas a cromatografia. Para tal, foi utilizada a melhor dose determinada para cães hípidos da raça Beagle, qual seja, 2mg/Kg, via oral<sup>6</sup>.

## 2.1 Farmacocinética do LASSBio 294 em coelhos

A primeira etapa realizada com dois coelhos hígidos que receberam, por via oral, uma cápsula com 2mg/Kg de LASSBio-294. As cápsulas com o composto foram administradas às sete horas da manhã. Os animais foram submetidos a coleta de sangue para estudo farmacocinético nos seguintes tempos: antes da administração (T0) e após administração do LASSBio-294: T1h; T2h; T4h; T6h; T12h e T24h. Ainda, foram submetidos a avaliações eletrocardiográficas, ecodopplercardiográficas e mensuração de pressão arterial.

### 2.1.1 Preparação das amostras plasmáticas para realização de CLAE

Cada amostra armazenada em tubos de *ependorf* (200µL), era deixada previamente em temperatura ambiente até seu completo descongelamento. Em seguida cada amostra passou por 2 tipos de extração.

Na primeira extração eram acrescidos 100µL de metanol a cada amostra, esta era homogeneizada com auxílio de Vortex e após homogeneização as mesmas foram centrifugadas durante cinco minutos a 100.000rpm em micro centrífuga (HT<sup>®</sup> modelo MCD-2000). Na segunda extração era preparada solução com 3mL de acetato de etila, 3mL de acetonitrila e 4mL de clorofórmio. Assim como na primeira extração, desta solução (100µL) eram homogeneizados com 200µL de amostra, e posteriormente centrifugadas.

As análises de CLAE foram realizadas com o sobrenadante resultante da centrifugação, após cada uma das extrações.

### 2.1.2 Cinética de formação dos metabólitos

Após preparação das amostras (2.2) as alíquotas obtidas foram injetadas (20µL) em cromatógrafo líquido da marca Gilson, equipado com duas bombas modelo 321 da Gilson, injetor manual Rheodyne com capacidade de 20µL, detector UV modelo 152 Gilson, coluna ACE 5C 18 (250 x 4,6mm ).

As fases móveis foram preparadas utilizando metanol àgua 65:35, para tanto foi utilizado água purificada pelo sistema Milli-Q (Millipore, São Paulo, Brasil) e metanol grau HPLC (J.T.BAKER). Sendo os solventes filtrados em membranas Millipore de 0,45µm e 47 mm de diâmetro, degaseificados em banho de ultrassom Thornton T7 por 15 minutos. O substrato LASSBio-294 foi solubilizado em metanol, para obter uma concentração final de  $6 \times 10^{-8}$  mg/µL e injetado em CLAE.



Os perfis de concentrações plasmáticas versus tempo foram adquiridas para cada animal. A concentração plasmática máxima ( $C_{\max}$ ) e o tempo para  $C_{\max}$  ( $T_{\max}$ ) foram obtidos diretamente a partir dos dados. Os outros principais parâmetros farmacocinéticos foram calculados utilizando o método não compartimental. A constante da taxa de eliminação ( $\lambda$ ) foi estimada a partir do declive da regressão dos quadrados mínimos da porção terminal da curva de concentração plasmática-tempo. A eliminação aparente da meia-vida ( $t_{1/2}$ ) foi calculada como  $\ln 2/\lambda$ . A área sob a curva concentração plasmática-tempo do tempo zero (pré-dose) para a última concentração mensurável ( $AUC_{0-24}$ ) foi calculada utilizando a regra trapezoidal linear. A AUC de 0 a infinito ( $ASC_{0-\infty}$ ) foi calculada como a  $ASC_{0-\infty} = ASC_{0-t} + C_t / \lambda$ .  $C_t$  é a última concentração plasmática avaliada que seja maior do que o limite inferior de quantificação. O tempo médio de retenção (TRM) foi obtido dividindo a área do primeiro tempo-momento da curva ( $AUMC_{0-\infty}$ ) pela área da curva ( $AUC_{0-\infty}$ ).  $V_{z/F}$  foi o volume aparente de distribuição.  $Cl/F$  foi a taxa de depuração.  $C_{\text{final}}$  foi a última concentração medida no plasma. A análise dos dados dos parâmetros farmacocinéticos foi realizada por meio do software Projeto R de computação estatística (versão R-2.11.1) usando o pacote "PK" e o add-in para excel PKSolver (versão 2.0)<sup>12,13</sup>. Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados por meio do método não compartimental.

## 2.2 Delineamento experimental

Para o estudo da ação do LASSBio 294 em coelhos com CMD foram adquiridos treze coelhos machos adultos, da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*), de um produtor local (Coelho Forte – Bela Vista-GO). Os animais foram submetidos a avaliação clínica e laboratorial para confirmação de sua higidez e então alojados na Unidade Experimental de Roedores e Lagomorfos da EVZ/UFG em gaiolas individuais, com temperatura ambiente controlada a 24°C, com livre acesso a água e ração, sendo oferecida cenoura ou folhagem escura, uma vez por semana. Para a indução da cardiomiopatia dilatada foi administrada doxorrubicina na dose 1mg/Kg (Cloridrato de Doxorrubicina®, Eurofarma, São Paulo, SP), via endovenosa, na concentração de 2mg/mL, duas vezes por semana, durante três semanas e, posteriormente, uma vez por semana até que os coelhos apresentassem fração de encurtamento igual ou inferior a 25%, à avaliação ecocardiográfica, configurando disfunção sistólica.

Após o desenvolvimento da disfunção sistólica, os coelhos foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos. O primeiro grupo era composto por sete coelhos e recebeu, via

oral, aproximadamente 2mg/Kg de LASSBio 294 a cada 12 horas, por 30 dias. O segundo grupo era composto por seis coelhos e recebeu, via oral, aproximadamente 0,3mg/Kg de pimobendana<sup>14</sup>, a cada 12 horas, por 30 dias. Ambos os medicamentos foram administrados em forma de solução alcoólica, no volume final de 1mL/animal.

As avaliações cardiológicas foram compostas dos seguintes exames: eletrocardiograma, ecodopplercardiograma, avaliação da pressão arterial, avaliação radiográfica torácica, dosagem de biomarcadores de lesão cardíaca, renal e hepática e avaliação hematológica. Os animais foram avaliados antes da administração dos tratamentos, no momento em que desenvolveram a disfunção sistólica (S0) e, posteriormente, foram realizadas avaliações semanais até o tempo de trinta dias (S0-S1-S2-S3-S4).

### 2.2.1 Avaliação eletrocardiográfica

Para a obtenção do eletrocardiograma (ECG), foi utilizado aparelho computadorizado – módulo de aquisição de ECG para computador/ECG-PC (versão 6.2 – Revisão 1 Copyright © 1997-2011 - Tecnologia Eletrônica Brasileira –TEB), na velocidade de 50 mm/s e calibrado para 1mV igual 1cm<sup>15</sup>, sendo os registros arquivados em microcomputador.

Com os animais contidos em decúbito esternal, em cada membro locomotor foi acoplado um eletrodo, permitindo a obtenção simultânea dos traçados eletrocardiográficos nas derivações bipolares DI, DII, DIII, e nas unipolares aVR, aVL e aVF, monitorados durante cinco minutos.

As análises dos registros foram realizadas na derivação DII, em 2N, com a obtenção dos seguintes parâmetros: ritmo e frequência cardíaca (bpm), duração (segundos) e amplitude (mV) da onda P e do complexo QRS, duração dos intervalos P-R e Q-T, amplitude da onda T e eixo cardíaco elétrico médio, no plano frontal, expresso em graus, considerando os valores publicados para a espécie<sup>14,16</sup>.

### 2.2.2 Avaliação ecodopplercardiográfica

O estudo ecodopplercardiográfico foi realizado utilizando o aparelho de ecodopplercardiografia (My Lab30Vet – Esaote/Pie Medical).

Para a realização dos ecodopplercardiogramas os animais foram submetidos a tricotomia do tórax e posicionados sequencialmente em decúbito lateral direito e esquerdo

para a obtenção das imagens, seguindo-se a aplicação de gel acústico para uma melhor condução das ondas<sup>14</sup>. Utilizando transdutor multifrequencial *phased array* de 7,5/10,0MHz posicionando-o nas janelas paraesternal direita e esquerda, as imagens foram analisadas de acordo com o preconizado por Bonagura & Fuentes<sup>17</sup> e Boon<sup>18</sup>.

Foram utilizados os modos bidimensional, modo-M, Doppler pulsado (PW), Doppler contínuo (CW), fluxo em cores (CF) e Doppler Tecidual (DT). A avaliação qualitativa do coração foi obtida pelo modo bidimensional, fornecendo informações quanto ao movimento, anatomia cardíaca e relação espacial, bem como servindo de orientação para as imagens de modo-M, por meio do qual foi realizada análise quantitativa, em sístole e diástole, das dimensões das câmaras cardíacas, espessura da parede livre do ventrículo esquerdo e do septo interventricular e avaliação dos movimentos valvares, permitindo, assim, cálculos de índices funcionais como a fração de encurtamento e fração de ejeção<sup>18</sup>.

Por meio da ecocardiografia Doppler (pulsado, contínuo e de fluxo em cores), foram identificados os fluxos sanguíneos transvalvares, quantificando-os quanto à direção, velocidade e turbulência, estabelecendo a presença ou ausência de insuficiência valvar decorrente de regurgitações. O Doppler de fluxo em cores foi empregado para permitir uma melhor e mais adequada identificação e avaliação qualitativa do fluxo sanguíneo, bem como para auxiliar o posicionamento do cursor para a sua avaliação quantitativa.

O Doppler pulsado permitiu mensurar a função diastólica dos coelhos por meio da avaliação do fluxo transmitral obtendo-se os valores de velocidade máxima da onda E ( $V_{máx. E}$ ), velocidade máxima da onda A ( $V_{máx. A}$ ), relação E/A ( $E/A$ ) e tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV). A avaliação ecocardiográfica Doppler tecidual do anel mitral e da parede livre do ventrículo esquerdo, em cortes transversal e apical, permitiram a avaliação quantitativa da velocidade de movimentação do miocárdio, consequentemente da função diastólica dos coelhos, por meio do cálculo da velocidade diastólica precoce ( $E'$ ), velocidade diastólica tardia ( $A'$ ), relação  $E'/A'$ , e relação  $E/E'$ .

Os ecodopplercardiogramas foram realizados e analisados de acordo com os critérios da Sociedade Americana de Ecocardiografia e do Comitê de Ecocardiografia do Colégio Americano de Medicina Interna Veterinária<sup>18,19</sup>. Os valores obtidos foram analisados de acordo com os publicados para a espécie<sup>14,16,20,21</sup>.

### 2.2.3 Mensuração da pressão arterial

A pressão arterial foi mensurada utilizando-se o método Doppler, com aparelho

Parks Medical Ultrasonic Doppler 812<sup>®</sup> (Parks Medical, Estados Unidos) e esfigmomanômetro Henik Gamma G5 (Heine, Alemanha). Em um ambiente tranquilo e climatizado os coelhos foram contidos em decúbito esternal sobre uma mesa, tendo o manguito do aparelho acoplado na posição distal do rádio e ulna esquerdos e posicionamento do transdutor sob a região das artérias palmares comuns, próximo às articulações dos carpos com metacarpos. A circunferência do membro locomotor de cada animal foi mensurada para determinação do comprimento e largura ideais do manguito (largura=40% da circunferência do membro e comprimento=1,5 vezes a circunferência do membro). O manguito foi colocado ao nível do átrio direito<sup>22,23</sup>. Em cada avaliação, foram obtidas cinco tomadas consecutivas da pressão arterial sistólica (PAS) de cada animal, descartando as duas mais discrepantes. O valor final de cada um desses parâmetros foi representado pela média aritmética das três mensurações restantes<sup>23</sup>.

Após a mensuração da pressão arterial pelo método Doppler, utilizou-se o método Oscilométrico (PetMap<sup>®</sup>, Ramsey Medical Inc., Estados Unidos). Após o aparelho ter sido ligado, este foi conectado ao mesmo manguito utilizado com método Doppler, então, realizou-se a mensuração da pressão. Em cada avaliação, foram obtidas cinco tomadas consecutivas das pressões arteriais sistólica (PAS), diastólica (PAD), média (PAM) e da frequência cardíaca de cada animal, descartando a menor e a maior mensuração e sendo o valor final a média aritmética das três mensurações<sup>22,23</sup>. As mensurações foram realizadas por um único avaliador para minimizar a variação individual.

#### 2.2.4 Avaliação radiográfica do tórax

Os exames radiográficos do tórax foram realizados utilizando o aparelho de Raios-X fixo, da marca Philips modelo KL.74/20.40 (Philips Healthcare<sup>®</sup>, Biassono, Itália), com capacidade para 500mA. Foram empregados cassetes radiográficos 18×24cm da marca Fuji IP cassette type CC. Os cassetes foram lidos em reveladora computadorizada da marca Fujifilm, modelo CR-IR (Fujifilm Corporation, Tóquio, Japão) e após obtidas as imagens foram trabalhadas em software OsiriX lite<sup>®</sup> (Pixmeo<sup>®</sup> SARL, Genebra, Suíça).

Para realização do exame radiográfico, os coelhos foram posicionados em decúbito lateral direito para realização de projeção látero-lateral direita e em decúbito dorsal, para projeção ventro-dorsal. A análise das radiografias foi realizada pelo método de mensuração *Vertebral Heart Size*, descrito por Buchanan & Bücheler<sup>24</sup>. Adjunto, foi avaliada a radiopacidade pulmonar como descrito por Thrall<sup>25</sup>, descrevendo-se achados sugestivos de

acúmulos de líquidos (edema pulmonar), avaliando-se também o espaço pleural quanto ao acúmulo de líquidos indicativos de efusão pleural.

#### 2.2.5 Avaliação hematológica e bioquímica

As amostras de sangue (5,0mL) foram coletadas em dia posterior às demais avaliações cardiológicas, para evitar alterações hematológicas provocadas pelo estresse, por venopunção társica, localizada na face lateral do membro pélvico, sendo realizada tricotomia da região e aplicação de pomada anestésica dez minutos antes da coleta. Dos 5,0mL coletados, 0,5mL foi acondicionado em frasco com etilenodiaminotetracetato (EDTA) e o restante em frasco sem anticoagulante. As amostras de sangue foram centrifugadas a 1500 rotações por minuto (rpm) durante dez minutos, para separação do soro e posteriormente divididas e acondicionadas em tubos de *eppendorf*.

Os hemogramas foram realizados em analisador automático modelo BC-2800 vet<sup>®</sup> (Mindray, Pequim, China), e as contagens diferenciais dos leucócitos foram realizadas em esfregaços de sangue fixados em metanol e corados por Giemsa-MMG.

Para as análises bioquímicas foram utilizados *kits* comerciais padronizados Labtest<sup>®</sup> (Labtest Diagnóstica S. A., Lagoa Santa – MG), sendo a leitura realizada em espectrofotômetro semi-automático (Analisador Bioquímico Automático CM200<sup>®</sup>, Winerlab, Rosário, Argentina). Os *kits* e as metodologias utilizados encontram-se dispostos no Quadro 1.

QUADRO 1 – Kits e métodos utilizados para avaliar parâmetros bioquímicos em coelhos com cardiomiopatia dilatada induzida por doxorubicina:

<b>KIT</b>	<b>FINALIDADE</b>	<b>MÉTODO</b>
<b>Albumina</b>	Sistema para determinação de albumina em amostras de soro	Colorimétrico (Verde de Bromocresol)
<b>ALT/GPT Liquiform</b>	Sistema para determinação da alanina aminotransferase (ALT) ou transaminase glutâmico pirúvica (GGT) em modo cinético	Cinética UV-IFCC
<b>AST/GOT Liquiform</b>	Sistema para determinação quantitativa em modo cinético contínuo da aspartato aminotransferase (AST) em soro ou plasma	Cinética UV-IFCC
<b>Cálcio Liquiform</b>	Sistema para determinação do cálcio por reação de ponto final em amostras de sangue e urina	Colorimétrico (CPC-Cresolfaleína)
<b>CK-MB Liquiform</b>	Sistema para determinação quantitativa da atividade da isoenzima MB da creatinaquinase (CK-MB) em modo cinético em soro ou plasma	UV-Imuoinibição-IFCC
<b>CK-Nac Liquiform</b>	Sistema para determinação em modo cinético da creatinaquinase total (CK) em soro ou plasma	UV-IFCC
<b>Creatinina K</b>	Sistema para a determinação quantitativa da creatinina em amostras de soro, plasma e urina e líquido amniótico por reação cinética de dois pontos	Colorimétrico (Picrato Alcalino – Jaffé)
<b>Fosfatase Alcalina Liquiform</b>	Sistema para determinação da fosfatase alcalina (ALP) em soro	Colorimétrica (Bowers e MC Comb modificado)
<b>Fósforo UV Liquiform</b>	Sistema para determinação do fósforo inorgânico por fotometria em ultravioleta, com reação de ponto final, em soro, plasma e urina	UV (Daly e Erteingshausen modificado)
<b>LDH Liquiform</b>	Sistema para a determinação em modo cinético da desidrogenase láctica (LDH) em amostra de soro ou plasma	UV – Método Piruvato-Lactato
<b>Potássio enzimático</b>	Sistema para determinação quantitativa do íon potássio em amostras de soro, por reação enzimática, em modo cinético	Enzimática
<b>Proteínas totais</b>	Sistema para a determinação das proteínas totais em amostras de soro e líquidos pleural, sinovial e ascítico por reação de ponto final	Colorimétrica (Biureto)
<b>Uréia UV liquiform</b>	Sistema enzimático para determinação da uréia por fotometria em ultravioleta usando cinética de dois pontos (Tempo fixo)	Enzimático UV

### 2.2.6 Avaliação anatomopatológica

Após a última avaliação, ao trigésimo dia de tratamento, os animais foram submetidos a eutanásia para avaliação anatomopatológica. Como método de eutanásia foi utilizada injeção endovenosa de tiopental sódico (Thiopental®, Cristália, São Paulo, SP), seguida de solução de cloreto de potássio a 10% (Cloreto de Potássio 10%®, Equiplex, Aparecida de Goiânia, GO).

Os animais foram pesados e, em seguida, realizada a avaliação macroscópica do cadáver. Do coração foram mensurados o peso, a relação peso do coração/peso corpóreo e a extensão dos eixos cardíacos vertical e horizontal. Outros seis corações de coelhos saudáveis foram empregados para confecção de lâminas controle e também foram mesurados e pesados, esse dados foram comparados com um grupo de animais com CMD.

Os corações foram coletados inteiros e armazenados em frascos individuais, identificados, contendo solução de formalina tamponada a 10%. Decorridas 48 horas de fixação, os corações foram cortados e os fragmentos processados e incluídos em parafina. Em seguida, foram confeccionados cortes histológicos de 5µm, que foram distendidos sobre lâminas de vidro e corados com Hematoxilina Eosina (HE) e Tricrômico de Masson.

As alterações microscópicas foram avaliadas de acordo com critérios adaptados de por Gava et al.<sup>26</sup>, considerando as variáveis vacuolização citoplasmática, fragmentação de miofibrilas, edema intersticial, necrose e fibrose. As alterações fora avaliadas de acordo com sua extensão nos fragmentos de miocárdio, sendo atribuído o escore (0) quando ausentes; um (1) quando em localização focal; dois (2) quando focal e extensa ou multifocal restrita; e três (3) quando lesões difusas ou multifocais envolvendo todo o fragmento avaliado.

### 2.2.7 Análise estatística

O experimento foi inteiramente casualizado em esquema de parcelas subdivididas 2×5, sendo os tratamentos as parcelas (LASSBio 294 e pimobendana), os períodos de avaliação, as subparcelas (S<sub>0</sub>– S<sub>1</sub>– S<sub>2</sub>– S<sub>3</sub>– S<sub>4</sub>) e cada animal uma unidade experimental. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas empregando-se teste de Tukey para avaliação dos tratamentos e seus diferentes momentos e teste de Kruskal-Wallis para avaliação dos escores de lesões histopatológicas dos diferentes tratamentos, adotando-se nível de significância de 5%. O teste de normalidade utilizado foi o Shapiro-Wilk. Empregando-se *software* estatístico R® (The R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Estudo farmacocinético e dos metabólitos do LASSBio 294 em coelhos

Após a administração, via oral, de 2mg/kg de LASSBio-294, para coelhos saudáveis e coletado o sangue nos tempos pré-determinados, obteve-se o perfil da curva de concentração plasmática e os parâmetros farmacocinéticos do LASSBio-294 em coelhos saudáveis, representados na Figura 1 e na Tabela 1.

Os animais não apresentaram alterações clínicas nem mudanças de comportamento durante o estudo. Observou-se aumento progressivo dos índices sistólicos dos coelhos, obtendo-se os maiores valores seis horas após a administração do composto, sendo a fração de encurtamento 48,27% maior que no tempo zero, com concomitante aumento da espessura da parede livre do VE, do septo interventricular e do diâmetro interno do VE em diástole e diminuição do diâmetro interno em sístole. Nesse mesmo momento, foi observado o menor valor de pressão sistólica, sem hipotensão. Não foram observados eventos arritmicos, e a frequência cardíaca manteve-se dentro dos valores normais para a espécie em todos os momentos.

Foram propostos dois metabólitos, sendo estes o: 3,4-dihidroxibenzohidrazida e 1,3-benzodioxoico (Figura 2).

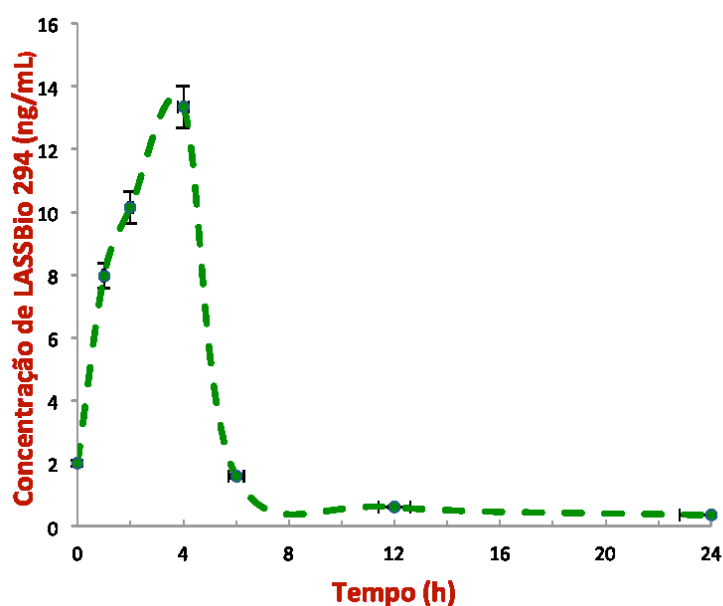


FIGURA 1 - Perfil das concentrações plasmáticas após administração via oral de 2mg/kg do LASSBio-294 em coelhos Nova Zelândia hígidos (média  $\pm$  DP, n = 2).



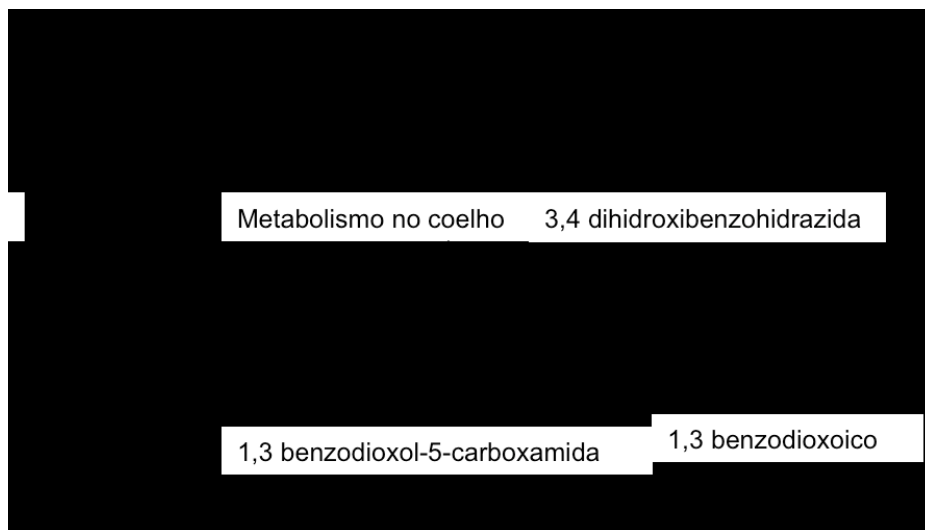


FIGURA 2 - Estrutura química do LASSBio-294 e seus metabólitos propostos, após administração oral de LASSBio-294 em coelhos Nova Zelândia.

TABELA 1 - Parâmetros farmacocinéticos após administração via oral de 2mg/kg do LASSBio-294 em coelhos Nova Zelândia hípidos (média, n = 2). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016).

Parâmetros	2mg/Kg média (n=2)
AUC (0-24) (ngh/mL)	64,75
AUC (0-∞) (ngh/mL)	0,93
MRT (h)	6,68
T <sub>1/2</sub> (h)	8,82
T max (h)	4,00
Cmax(ng/mL)	13,33
C <sub>1/F</sub> (mg/Kg)/(ng/mL)/h	0,02
V <sub>Z/F</sub> (mg/Kg)/ (ng/mL)	0,36
AUC (0-24) (ngh/mL)	64,75
AUC (0-∞) (ngh/mL)	0,93

Onde: AUC: área sob a curva concentração plasmática-tempo; MRT: monitoramento de múltiplas reações; T<sub>1/2</sub>: meia-vida plasmática; T máx: tempo para C<sub>máx</sub>; C<sub>máx</sub>: concentração plasmática máxima; C<sub>1/F</sub>: taxa de depuração; V<sub>Z/F</sub>: volume aparente de distribuição

### 3.2 Ação do LASSBio 294 em coelhos com CMD

#### 3.2.1 Mortalidade

Considerando o protocolo de indução proposto, dos sete coelhos que compuseram o grupo A, tratado com LASSBio 294, três animais receberam 9mg/Kg (seis semanas de indução), 11mg/Kg (oito semanas de indução) e 12mg/Kg (nove semanas de indução) de dose

acumulada de doxorubicina, respectivamente, dois receberam 13mg/Kg (10 semanas de indução) e outros dois receberam 15mg/Kg (12 semanas de indução).

Os outros seis coelhos compuseram o grupo tratado com pimobendana, sendo que dois receberam dose acumulada de 13mg/kg de doxorubicina (10 semanas de indução), dois de 15mg/Kg (12 semanas de indução) de doxorubicina e outros dois receberam 17mg/Kg de doxorubicina (14 semanas de indução).

Dois dos sete coelhos alocados no grupo A (LASSBio 294) morreram entre a segunda e terceira semana, o que configura taxa de mortalidade de 28,57% neste grupo. Os animais pertencentes ao grupo B (pimobendana) sobreviveram a todo o período experimental.

### 3.2.2 Avaliação clínica

Três coelhos do grupo A apresentaram alterações clínicas compatíveis com quadro de insuficiência cardíaca congestiva (ICC).

Dois animais apresentaram efusão pleural e abdominal, sendo que um destes ainda apresentou efusão pericárdica e mucosas hipocoradas e o outro apresentou edema testicular e na região ventral do pescoço. Ambos apresentaram os sinais após a primeira semana de tratamento e morreram entre a segunda e terceira semanas.

O terceiro animal a apresentar alterações compatíveis com ICC, desenvolveu pequeno volume de efusão pleural, detectada na avaliação ecocardiográfica, a partir da terceira semana.

Quatro dos seis animais do grupo B desenvolveram edema testicular, porém não foram observadas efusões. Um destes animais já apresentava a alteração no início do tratamento e o outro a desenvolveu após a primeira semana de tratamento. Ambos os edemas diminuíram ao longo do tratamento.

### 3.2.3 Avaliação eletrocardiográfica

Durante o tratamento de quatro semanas com LASSBio 294 e com pimobendana (grupo controle), foi observada diferença na duração do complexo QRS entre os grupos, nos momentos três e quatro, sendo as maiores médias referentes aos animais do grupo B. A amplitude da onda R também foi maior no grupo B em S1. O intervalo QT aumentou nos dois grupos, porém seu aumento foi significativo somente no grupo A e na segunda semana de tratamento. A amplitude da onda P foi diferente entre os grupos na quarta semana de

tratamento, sendo a maior média pertencente aos animais do grupo A. Nesse mesmo momento também houve diferença na frequência cardíaca dos animais, a qual foi menor no grupo tratado com pimobendana. Esta variável também foi diferente estatisticamente dentro do grupo B, ao se comparar as médias de S0 e S4, observando-se queda gradual da variável ao longo dos diferentes momentos de avaliação (Tabela 2).

Foram observadas algumas alterações na morfologia das ondas T durante o tratamento, no grupo A. Em S1, um coelho, apresentou ondas T bifásicas. Na segunda semana, dois animais apresentaram ondas T bifásicas. Na terceira e quarta semanas, um coelho apresentou ondas T negativas. Os coelhos do grupo tratado com pimobendana apresentaram ondas T positivas em todos os momentos.

Quanto ao ritmo, os coelhos tratados com LASSBio 294, apresentaram complexos ventriculares prematuros (CVPs) na primeira(n=1) e última (n=1) semanas de tratamento. Foi observada taquicardia atrial neste grupo nas semanas S2 (n=2) e S3 (n=1) (Figura 3). O grupo B, apresentou CVPs na segunda semana de tratamento (n=2). Os demais coelhos nos momentos mencionados apresentaram ritmo sinusal.



FIGURA 3 - Traçados eletrocardiográficos computadorizados, derivação II, calibração 2N, velocidade 50mm/s, obtidos de coelhos da raça Nova Zelândia, após da indução da cardiomiopatia dilatada e tratados com LASSBio 294. Em A nota-se taquicardia atrial, caracteriza pela presença de ondas P assimétricas e frequência cardíaca elevada. Na figura B a seta grande identifica um complexo QRS bizarro, caracterizando um complexo ventricular prematuro.

TABELA 2 - Valores das médias de amplitudes e duração das ondas P, complexo QRS, e intervalo dos segmentos P-R e Q-T e frequência cardíaca de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos, submetidos a tratamento com LASSBio 294 (A) ou controle positivo pimobendana (B), após o período de indução da cardiomiopatia dilatada (CMD) com doxorubicina e submetidos a avaliações semanais (S0, S1, S2, S3, S4). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016).

Variável	S	Tratamento	
		A	B
<b>P (ms)</b>	0	32,47 <sup>Aa</sup>	30,33 <sup>Aa</sup>
	1	32,99 <sup>Aa</sup>	34,00 <sup>Aa</sup>
	2	35,52 <sup>Aa</sup>	38,00 <sup>Aa</sup>
	3	34,89 <sup>Aa</sup>	35,78 <sup>Aa</sup>
	4	39,22 <sup>Aa</sup>	34,00 <sup>Aa</sup>
<b>P-R (ms)</b>	0	61,47 <sup>Aa</sup>	57,44 <sup>Aa</sup>
	1	60,47 <sup>Aa</sup>	62,11 <sup>Aa</sup>
	2	58,54 <sup>Aa</sup>	66,22 <sup>Aa</sup>
	3	68,05 <sup>Aa</sup>	66,00 <sup>Aa</sup>
	4	67,11 <sup>Aa</sup>	63,55 <sup>Aa</sup>
<b>QRS (ms)</b>	0	47,42 <sup>Aa</sup>	46,55 <sup>Aa</sup>
	1	44,61 <sup>Aa</sup>	48,44 <sup>Aa</sup>
	2	48,55 <sup>Aa</sup>	48,67 <sup>Aa</sup>
	3	43,65 <sup>Aa</sup>	53,55 <sup>Ba</sup>
	4	47,99 <sup>Aa</sup>	57,00 <sup>Ba</sup>
<b>Q-T (ms)</b>	0	125,85 <sup>Aa</sup>	132,99 <sup>Aa</sup>
	1	143,28 <sup>Aab</sup>	137,66 <sup>Aa</sup>
	2	151,26 <sup>Ab</sup>	146,00 <sup>Aa</sup>
	3	137,31 <sup>Aab</sup>	133,22 <sup>Aa</sup>
	4	143,04 <sup>Aab</sup>	139,44 <sup>Aa</sup>
<b>P (mV)</b>	0	0,035 <sup>Aa</sup>	0,043 <sup>Aa</sup>
	1	0,035 <sup>Aa</sup>	0,036 <sup>Aa</sup>
	2	0,036 <sup>Aa</sup>	0,040 <sup>Aa</sup>
	3	0,049 <sup>Aa</sup>	0,040 <sup>Aa</sup>
	4	0,051 <sup>Aa</sup>	0,033 <sup>Ba</sup>
<b>R (mV)</b>	0	0,10 <sup>Aa</sup>	0,13 <sup>Aa</sup>
	1	0,11 <sup>Aa</sup>	0,18 <sup>Ba</sup>
	2	0,13 <sup>Aa</sup>	0,17 <sup>Aa</sup>
	3	0,16 <sup>Aa</sup>	0,16 <sup>Aa</sup>
	4	0,15 <sup>Aa</sup>	0,14 <sup>Aa</sup>
<b>FC bpm</b>	0	193 <sup>Aa</sup>	242 <sup>Aa</sup>
	1	196 <sup>Aa</sup>	194 <sup>Aab</sup>
	2	226 <sup>Aa</sup>	176 <sup>Aab</sup>
	3	230 <sup>Aa</sup>	182 <sup>Aab</sup>
	4	226 <sup>Aa</sup>	160 <sup>Bb</sup>
<b>EEM graus</b>	0	30,85 <sup>oAa</sup>	50,00 <sup>oAa</sup>
	1	23,71 <sup>oAa</sup>	35,33 <sup>oAa</sup>
	2	33,18 <sup>oAa</sup>	35,33 <sup>oAa</sup>
	3	0,43 <sup>oAa</sup>	38,33 <sup>oAa</sup>
	4	26,56 <sup>oAa</sup>	36,33 <sup>oAa</sup>

Teste de Tukey, adotando-se nível de significância de 5%. Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença entre tratamento, letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença entre tempos, dentro do mesmo tratamento.

S: semana de tratamento. Valores em vermelho indicam diferença entre tratamentos

### 3.2.4 Avaliação Ecodopplercardiográfica

Em relação a avaliação ecocardiográfica em modo-B foi observada diferença no diâmetro da aorta dos animais dos diferentes grupos, na última semana de tratamento, sendo o maior diâmetro mensurado nos animais do grupo B. Não houve diferença entre os grupos na média calculada para o diâmetro do AE, mas as médias foram diferentes dentro do grupo A, obtendo-se o maior valor em S2, porém a relação AE/Ao não foi diferente entre os grupos, tampouco dentro dos grupos (Tabela 3). O modo-B também permitiu verificar a presença de efusão pleural e abdominal em dois coelhos do grupo A, na segunda semana o tratamento, sendo ainda detectada efusão pericárdica em um desses animais. Foi detectada efusão pleural em outro animal do grupo A na terceira semana do tratamento (Figura 3A). Não foram detectadas efusões nos animais do grupo B.

TABELA 3 - Valores dos parâmetros ecodopplercardiográficos, em modo M de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos, submetidos a tratamento com LASSBio 294 (A) ou controle positivo pimobendana (B), após o período de indução da cardiomiopatia dilatada (CMD) com doxorubicina e submetidos a avaliações semanais (S0, S1, S2, S3, S4). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016).

Variável	S	Tratamento	
		A	B
Ao (mm)	0	7,81 <sup>Aa</sup>	8,15 <sup>Aa</sup>
	1	8,10 <sup>Aa</sup>	9,15 <sup>Aa</sup>
	2	8,76 <sup>Aa</sup>	8,93 <sup>Aa</sup>
	3	8,89 <sup>Aa</sup>	9,40 <sup>Aa</sup>
	4	8,34 <sup>Aa</sup>	9,67 <sup>Ba</sup>
AE (mm)	0	9,99 <sup>Aa</sup>	10,01 <sup>Aa</sup>
	1	12,01 <sup>Aab</sup>	10,49 <sup>Aa</sup>
	2	13,61 <sup>Ab</sup>	12,11 <sup>Aa</sup>
	3	12,95 <sup>Aab</sup>	10,77 <sup>Aa</sup>
	4	13,25 <sup>Aab</sup>	12,26 <sup>Aa</sup>
AE/Ao	0	1,33 <sup>Aa</sup>	1,22 <sup>Aa</sup>
	1	1,49 <sup>Aa</sup>	1,16 <sup>Aa</sup>
	2	1,56 <sup>Aa</sup>	1,36 <sup>Aa</sup>
	3	1,50 <sup>Aa</sup>	1,15 <sup>Aa</sup>
	4	1,61 <sup>Aa</sup>	1,26 <sup>Aa</sup>
DIVEs (mm)	0	12,85 <sup>Aa</sup>	10,52 <sup>Aa</sup>
	1	12,06 <sup>Aa</sup>	9,47 <sup>Aa</sup>
	2	12,51 <sup>Aa</sup>	10,80 <sup>Aa</sup>
	3	11,35 <sup>Aa</sup>	9,53 <sup>Aa</sup>
	4	11,51 <sup>Aa</sup>	11,44 <sup>Aa</sup>
DIVEd (mm)	0	16,86 <sup>Aa</sup>	14,01 <sup>Aa</sup>
	1	17,15 <sup>Aa</sup>	13,49 <sup>Ba</sup>
	2	17,86 <sup>Aa</sup>	14,91 <sup>Ba</sup>
	3	16,08 <sup>Aa</sup>	13,77 <sup>Aa</sup>
	4	15,67 <sup>Aa</sup>	15,89 <sup>Aa</sup>

TABELA 3 - Valores dos parâmetros ecodopplercardiográficos, em modo M de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos, submetidos a tratamento com LASSBio 294 (A) ou controle positivo pimobendana (B), após o período de indução da cardiomiopatia dilatada (CMD) com doxorubicina e submetidos a avaliações semanais (S0, S1, S2, S3, S4). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016). (Continuação)

Variável	S	Tratamento	
		A	B
PLVEs (mm)	0	2,76 <sup>Aa</sup>	2,25 <sup>Aa</sup>
	1	3,02 <sup>Aa</sup>	2,60 <sup>Aa</sup>
	2	3,27 <sup>Aa</sup>	2,69 <sup>Aa</sup>
	3	2,81 <sup>Aa</sup>	2,93 <sup>Aa</sup>
	4	3,10 <sup>Aa</sup>	2,45 <sup>Aa</sup>
PLVEd (mm)	0	2,19 <sup>Aa</sup>	1,85 <sup>Aa</sup>
	1	2,29 <sup>Aa</sup>	2,76 <sup>Ab</sup>
	2	2,41 <sup>Aa</sup>	2,23 <sup>Aab</sup>
	3	2,12 <sup>Aa</sup>	2,25 <sup>Aab</sup>
	4	2,26 <sup>Aa</sup>	2,02 <sup>Aa</sup>
SIVs (mm)	0	1,97 <sup>Aa</sup>	2,23 <sup>Aa</sup>
	1	2,65 <sup>Ab</sup>	2,64 <sup>Aa</sup>
	2	2,66 <sup>Ab</sup>	2,37 <sup>Aa</sup>
	3	2,42 <sup>Aab</sup>	2,39 <sup>Aa</sup>
	4	2,16 <sup>Aab</sup>	2,39 <sup>Aa</sup>
SIVd (mm)	0	1,82 <sup>Aa</sup>	2,03 <sup>Aa</sup>
	1	1,96 <sup>Aa</sup>	2,10 <sup>Aa</sup>
	2	1,92 <sup>Aa</sup>	1,92 <sup>Aa</sup>
	3	1,68 <sup>Aa</sup>	2,17 <sup>Ba</sup>
	4	1,81 <sup>Aa</sup>	2,07 <sup>Aa</sup>
FE (%)	0	49,09 <sup>Aa</sup>	53,03 <sup>Aa</sup>
	1	60,23 <sup>Aa</sup>	60,22 <sup>Aa</sup>
	2	60,90 <sup>Aa</sup>	57,22 <sup>Aa</sup>
	3	61,09 <sup>Aa</sup>	62,11 <sup>Aa</sup>
	4	55,56 <sup>Aa</sup>	57,77 <sup>Aa</sup>
FS (%)	0	22,66 <sup>Aa</sup>	24,78 <sup>Aa</sup>
	1	30,19 <sup>Aab</sup>	29,44 <sup>Aa</sup>
	2	30,61 <sup>Ab</sup>	27,55 <sup>Aa</sup>
	3	29,88 <sup>Aab</sup>	31,11 <sup>Aa</sup>
	4	26,68 <sup>Aab</sup>	28,44 <sup>Aa</sup>

Onde: Ao: diâmetro da aorta; AE: diâmetro do átrio esquerdo; Ao/Ae: relação átrio esquerdo aorta; DIVE s/d: diâmetro interno do ventrículo esquerdo em sístole e diástole; PLVE s/d: parede livre do ventrículo esquerdo em sístole e diástole; SIV s/d: septo interventricular em sístole e diástole; FE: fração de ejeção; FS: fração de encurtamento

Teste de Tukey, adotando-se nível de significância de 5%. Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença entre tratamento, letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença entre tempos, dentro do mesmo tratamento.

S: semana de tratamento. Valores em vermelho indicam diferença entre tratamentos

A variável DIVEd, obtida por meio da avaliação do VE em modo-M, foi diferente entre os grupos nos momentos S1 e S2. A variável SIVd foi maior no grupo B, no momento S3. Houve diferenças nas médias calculadas da PLVEd dentro do grupo B em S1 e SIVs dentro do grupo A, também em S1. Não houve diferenças significativas em relação ao índice sistólico FE entre os animais do grupo A e B, tampouco entre as médias obtidas nos diferentes momentos, dentro do mesmo grupo. A fração de encurtamento por outro lado, foi maior no momento dois, dentro do grupo A, porém não houve diferença entre os grupos. Em ambos os grupos observou-se aumento progressivo das FE% e FS% e queda dessas no 30º dia de tratamento (Figura 4).

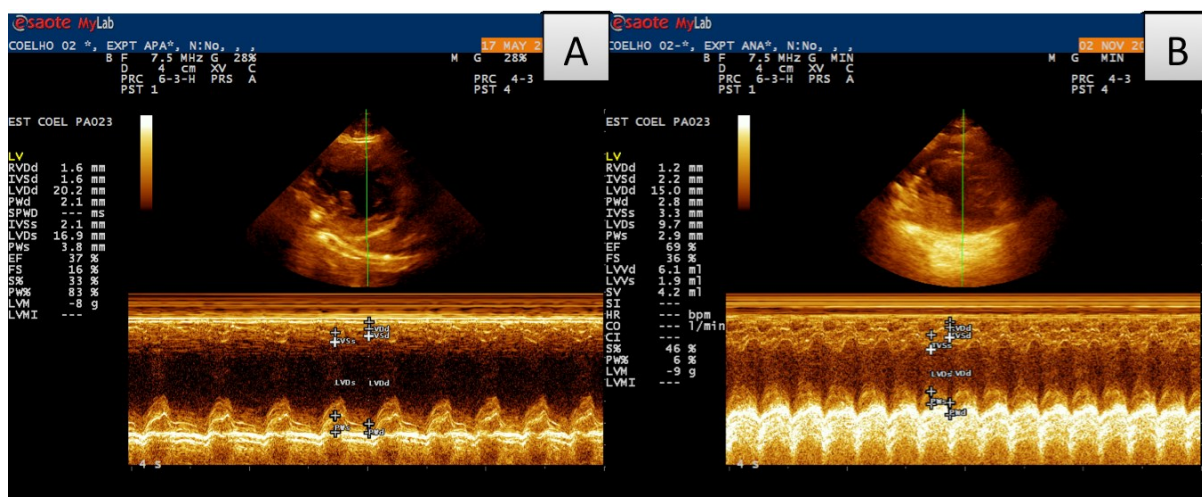


FIGURA 4: Imagens ecocardiográficas bidimensionais na parte superior e imagens em modo-M na parte inferior das figuras, obtidas pela janela paraesternal direita, de coelho Nova Zelândia, submetido a indução da cardiomiopatia dilatada e tratado com LASSBio 294 na dose de 2mg/Kg. Em A: Antes do início do tratamento, apresentando FS de 16%. B: Segunda semana de tratamento com LASSBio 294 na dose de 2mg/Kg, apresentando FS de 36%.

A avaliação com Doppler pulsado do fluxo transmitral revelou velocidade da onda E maior nos animais do grupo A na primeira semana de tratamento. Foi observada inversão da relação E/A da mitral em todos os momentos de avaliação no grupo B, ao contrário dos animais do grupo A que mantiveram relação E/A mitral maior que um, durante todo o período experimental (Figura 5A e B). O fluxo transtricúspide não alterou significativamente entre os grupos A e B, nem nos diferentes momentos, dentro dos grupos. Não houve diferenças significativas na avaliação do fluxo aórtico, entre os grupos ou dentro dos grupos. A velocidade máxima e o gradiente máximo do fluxo pulmonar no entanto, foi maior no grupo B em S2, sendo observada diferença dentro do grupo também a partir deste momento. O tempo de relaxamento isovolumétrico foi significativamente maior no grupo B, ao 30º dia de

tratamento (Figura 5E e F). Não houve diferenças entre os grupos, ou dentro dos grupos, em relação a variável volume sistólico (Tabela 4).

TABELA 4 - Valores das médias dos parâmetros ecodopplercardiográficos, em modo Doppler de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos, submetidos a tratamento com LASSBio 294 (A) ou controle positivo pimobendana (B), após o período de indução da cardiomiopatia dilatada (CMD) com doxorubicina e submetidos a avaliações semanais (S0, S1, S2, S3, S4). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016).

Variável	S	Tratamento	
		A	B
<b>V<sub>máxEm</sub></b> (m/s)	0	0,53 <sup>Aa</sup>	0,50 <sup>Aa</sup>
	1	0,61 <sup>Aa</sup>	0,51 <sup>Ba</sup>
	2	0,56 <sup>Aa</sup>	0,53 <sup>Aa</sup>
	3	0,51 <sup>Aa</sup>	0,46 <sup>Aa</sup>
	4	0,57 <sup>Aa</sup>	0,54 <sup>Aa</sup>
<b>V<sub>máxAm</sub></b> (m/s)	0	0,53 <sup>Aa</sup>	0,66 <sup>Aa</sup>
	1	0,52 <sup>Aa</sup>	0,59 <sup>Aa</sup>
	2	0,53 <sup>Aa</sup>	0,62 <sup>Aa</sup>
	3	0,48 <sup>Aa</sup>	0,50 <sup>Aa</sup>
	4	0,46 <sup>Aa</sup>	0,59 <sup>Aa</sup>
<b>E/A m</b>	0	1,04 <sup>Aa</sup>	0,76 <sup>Aa</sup>
	1	1,43 <sup>Aa</sup>	0,92 <sup>Aa</sup>
	2	1,63 <sup>Aa</sup>	0,90 <sup>Aa</sup>
	3	1,34 <sup>Aa</sup>	0,92 <sup>Aa</sup>
	4	1,54 <sup>Aa</sup>	0,96 <sup>Aa</sup>
<b>V<sub>máxEt</sub></b> (m/s)	0	0,56 <sup>Aa</sup>	0,55 <sup>Aab</sup>
	1	0,53 <sup>Aa</sup>	0,61 <sup>Aa</sup>
	2	0,52 <sup>Aa</sup>	0,52 <sup>Aab</sup>
	3	0,54 <sup>Aa</sup>	0,58 <sup>Aab</sup>
	4	0,47 <sup>Aa</sup>	0,45 <sup>Ab</sup>
<b>V<sub>máxAt</sub></b> (m/s)	0	0,41 <sup>Aa</sup>	0,50 <sup>Aa</sup>
	1	0,43 <sup>Aa</sup>	0,54 <sup>Aa</sup>
	2	0,49 <sup>Aa</sup>	0,38 <sup>Aa</sup>
	3	0,40 <sup>Aa</sup>	0,39 <sup>Aa</sup>
	4	0,43 <sup>Aa</sup>	0,41 <sup>Aa</sup>
<b>E/A t</b>	0	1,53 <sup>Aa</sup>	1,16 <sup>Aa</sup>
	1	1,31 <sup>Aa</sup>	1,19 <sup>Aa</sup>
	2	1,16 <sup>Aa</sup>	1,50 <sup>Aa</sup>
	3	1,54 <sup>Aa</sup>	1,70 <sup>Aa</sup>
	4	1,20 <sup>Aa</sup>	1,27 <sup>Aa</sup>
<b>V<sub>máxAo</sub></b> (ms)	0	0,55 <sup>Aa</sup>	0,70 <sup>Aa</sup>
	1	0,67 <sup>Aa</sup>	0,65 <sup>Aa</sup>
	2	0,56 <sup>Aa</sup>	0,60 <sup>Aa</sup>
	3	0,63 <sup>Aa</sup>	0,57 <sup>Aa</sup>
	4	0,58 <sup>Aa</sup>	0,66 <sup>Aa</sup>
<b>DC</b> mL/min	0	0,55 <sup>Aa</sup>	0,74 <sup>Aa</sup>
	1	0,77 <sup>Aa</sup>	0,88 <sup>Aa</sup>
	2	0,70 <sup>Aa</sup>	0,82 <sup>Aa</sup>
	3	0,79 <sup>Aa</sup>	0,67 <sup>Aa</sup>
	4	0,71 <sup>Aa</sup>	0,87 <sup>Aa</sup>



TABELA 4 - Valores das médias dos parâmetros ecodopplercardiográficos, em modo Doppler de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos, submetidos a tratamento com LASSBio 294 (A) ou controle positivo pimobendana (B), após o período de indução da cardiomiopatia dilatada (CMD) com doxorubicina e submetidos a avaliações semanais (S0, S1, S2, S3, S4). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016).(Continuação)

Variável	S	Tratamento	
		A	B
VmáxP (ms)	0	0,74 <sup>Aa</sup>	0,76 <sup>Aab</sup>
	1	0,64 <sup>Aa</sup>	0,95 <sup>Ba</sup>
	2	0,67 <sup>Aa</sup>	0,71 <sup>Ab</sup>
	3	0,63 <sup>Aa</sup>	0,62 <sup>Ab</sup>
	4	0,66 <sup>Aa</sup>	0,61 <sup>Ab</sup>
TRIV (msec)	0	55,23 <sup>Aa</sup>	45,77 <sup>Aa</sup>
	1	48,42 <sup>Aa</sup>	46,89 <sup>Aa</sup>
	2	46,57 <sup>Aa</sup>	49,77 <sup>Aa</sup>
	3	45,43 <sup>Aa</sup>	51,66 <sup>Aa</sup>
	4	41,76 <sup>Aa</sup>	54,89 <sup>Ba</sup>
VS mL	0	2,66 <sup>Aa</sup>	2,92 <sup>Aa</sup>
	1	3,14 <sup>Aa</sup>	3,89 <sup>Aa</sup>
	2	2,99 <sup>Aa</sup>	3,91 <sup>Aa</sup>
	3	3,40 <sup>Aa</sup>	3,43 <sup>Aa</sup>
	4	2,98 <sup>Aa</sup>	4,58 <sup>Aa</sup>

Onde: VmáxE<sub>m</sub>: velocidade máxima da onda E do fluxo mitral; VmáxA<sub>m</sub>: velocidade máxima da onda A do fluxo mitral; E/A<sub>m</sub>: relação entre as ondas E e A mitral; VmáxE<sub>t</sub>: velocidade máxima da onda E do fluxo tricúspide; VmáxA<sub>t</sub>: velocidade máxima da onda A do fluxo tricúspide; E/A<sub>t</sub>: relação entre as ondas E e A do fluxo tricúspide; VmáxA<sub>o</sub>: velocidade máxima do fluxo aórtico; DC: débito cardíaco; VmáxP: velocidade máxima do fluxo pulmonar; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; VS: volume sistólico

Teste de Tukey, adotando-se nível de significância de 5%. Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença entre tratamentos, letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença entre tempos, dentro do mesmo tratamento.

S: semana de tratamento. Valores em vermelho indicam diferença entre tratamentos

A avaliação com Doppler colorido detectou insuficiência trivial de mitral em dois animais do grupo A, na segunda semana do tratamento, sendo esses os mesmos que apresentaram efusões nesse momento. A insuficiência trivial de pulmonar foi detectada em um animal do grupo A e em dois animais do grupo B, nas segunda e terceira semanas de tratamento. Na quarta semana, dois animais do grupo A e quatro do grupo B, apresentavam insuficiência trivial de pulmonar (Figura 6B e C).

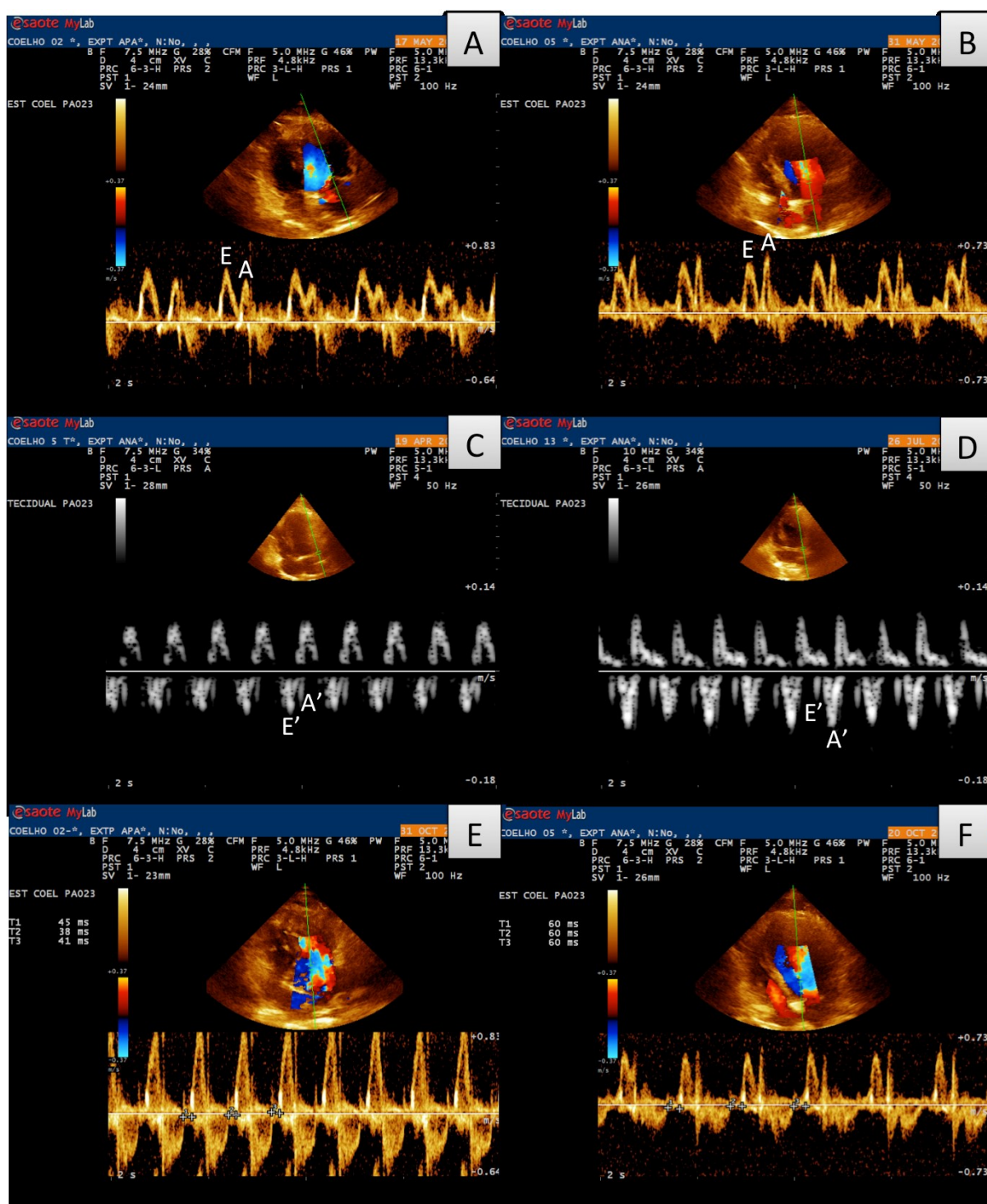


FIGURA 5: Imagens ecocardiográficas em modo Doppler pulsado e Doppler tecidual, obtidas pela janela paraesternal esquerda, de coelhos Nova Zelândia, submetidos a indução da cardiomiopatia dilatada e tratados com LASSBio 294 (2mg/Kg) ou pimobendana (0,3mg/Kg). A: Doppler pulsado do fluxo transmitral apresentando relação E/A  $> 1$ . B: Doppler pulsado do fluxo transmitral apresentando relação E/A  $< 1$ . C: Doppler tecidual altura do anel mitral apresentando relação E'/A'  $> 1$ . D: Doppler tecidual altura do anel mitral apresentando relação E'/A'  $< 1$ . E: Tempo de relaxamento isovolumétrico normal (41-46ms). F: Tempo de relaxamento isovolumétrico aumentado (60ms).

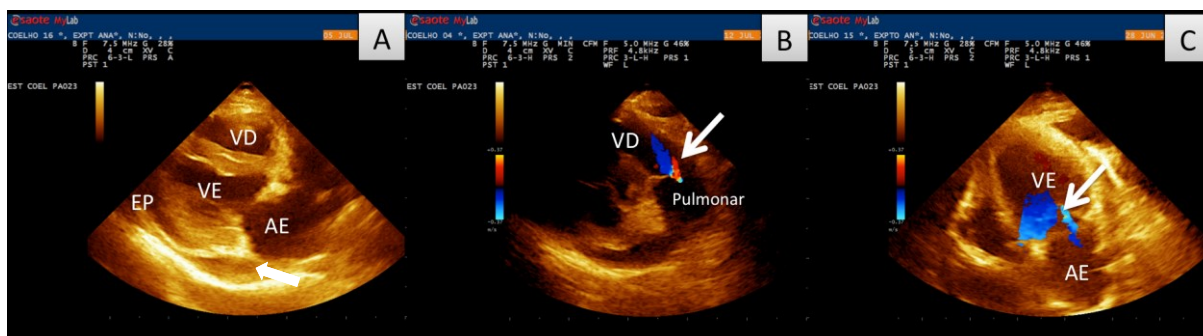


FIGURA 6: Imagens ecocardiográficas em modo bidimensional e Doppler colorido de coelhos Nova Zelândia, submetidos a indução da cardiomiopatia dilatada e tratado com LASSBio 294 na dose de 2mg/Kg. Em A: Nota-se efusão pericárdica (EP) e efusão pleural (seta), caracterizado por acúmulo de conteúdo anecóico em saco pericárdico e cavidade torácica, imagem obtida pela janela paraesternal direita eixo longo. B: Nota-se insuficiência pulmonar trivial (seta), imagem obtida pela janela paraesternal direita eixo curto ao nível da artéria pulmonar. C: Nota-se insuficiência trivial de mitral (seta), imagem obtida pela janela paraesternal esquerda, vista apical quatro câmaras.

A avaliação Doppler tecidual mostrou queda progressiva da velocidade da onda E' em corte transversal nos animais do grupo A, sendo a média calculada menor e diferente dos animais do grupo B na quarta semana de tratamento. A relação E'/A' em corte transversal foi maior no grupo A na primeira semana de tratamento, observando-se diferença estatística também dentro do grupo, quando comparada a média obtida no tempo zero. A relação E/E' em eixo transversal foi maior nos animais do grupo A, em S4. As velocidades da onda E'L e A'L apical na altura do anel mitral foram diferentes entre os grupos nos momentos S0 e S1 para a variável E'L e em S2 para a variável A'L, sendo os menores valores pertencentes aos animais do grupo A. A relação E'L/A'L em corte apical, na altura do anel mitral foi maior que um no grupo A, nas semanas um, dois e quatro do tratamento, observando-se diferença estatística entre os tratamentos, na semana dois (Figura 5C e D). Essa mesma variável apresentou variações dentro dos diferentes grupos, observando-se quedas graduais dentro do grupo B e aumento na semana dois, dentro do grupo A. A relação E/E'L corte apical, na altura do anel mitral, foi maior nos animais do grupo A no tempo zero, observando aumento gradual da média dos animais dentro do grupo B.

TABELA 5 - Valores das médias dos parâmetros ecodopplercardiográficos, em modo Doppler tecidual de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos, submetidos a tratamento com LASSBio 294 (A) ou controle positivo pimobendana (B), após o período de indução da cardiomiopatia dilatada (CMD) com doxorrubicina e submetidos a avaliações semanais (S0, S1, S2, S3, S4). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016).

Variável	S	Tratamento	
		A	B
<b>E'</b> (m/s)	0	0,05 <sup>Aab</sup>	0,06 <sup>Aa</sup>
	1	0,06 <sup>Ab</sup>	0,06 <sup>Aa</sup>
	2	0,06 <sup>Aab</sup>	0,04 <sup>Aa</sup>
	3	0,05 <sup>Aab</sup>	0,05 <sup>Aa</sup>
	4	0,04 <sup>Aa</sup>	0,06 <sup>Ba</sup>
<b>A'</b> (m/s)	0	0,06 <sup>Aa</sup>	0,08 <sup>Aa</sup>
	1	0,05 <sup>Aa</sup>	0,07 <sup>Aa</sup>
	2	0,07 <sup>Aa</sup>	0,06 <sup>Aa</sup>
	3	0,06 <sup>Aa</sup>	0,08 <sup>Aa</sup>
	4	0,06 <sup>Aa</sup>	0,06 <sup>Aa</sup>
<b>E'/A'</b>	0	0,82 <sup>Aa</sup>	0,72 <sup>Aa</sup>
	1	1,59 <sup>Ab</sup>	0,82 <sup>Ba</sup>
	2	0,93 <sup>Aa</sup>	0,65 <sup>Aa</sup>
	3	1,12 <sup>Aab</sup>	0,59 <sup>Aa</sup>
	4	0,70 <sup>Aa</sup>	1,38 <sup>Aa</sup>
<b>E/E'</b>	0	11,11 <sup>Aa</sup>	9,27 <sup>Aa</sup>
	1	9,36 <sup>Aa</sup>	8,69 <sup>Aa</sup>
	2	10,56 <sup>Aa</sup>	12,25 <sup>Aa</sup>
	3	10,03 <sup>Aa</sup>	9,42 <sup>Aa</sup>
	4	12,88 <sup>Aa</sup>	8,31 <sup>Ba</sup>
<b>E'L</b>	0	0,05 <sup>Aa</sup>	0,08 <sup>Bab</sup>
	1	0,06 <sup>Aa</sup>	0,10 <sup>Ba</sup>
	2	0,07 <sup>Aa</sup>	0,05 <sup>Ab</sup>
	3	0,05 <sup>Aa</sup>	0,06 <sup>Ab</sup>
	4	0,06 <sup>Aa</sup>	0,05 <sup>Ab</sup>
<b>A'L</b>	0	0,08 <sup>Aa</sup>	0,08 <sup>Aa</sup>
	1	0,06 <sup>Aa</sup>	0,07 <sup>Aa</sup>
	2	0,04 <sup>Aa</sup>	0,08 <sup>Ba</sup>
	3	0,07 <sup>Aa</sup>	0,09 <sup>Aa</sup>
	4	0,06 <sup>Aa</sup>	0,09 <sup>Aa</sup>
<b>E'L/A'L</b>	0	0,77 <sup>Aa</sup>	1,34 <sup>Aa</sup>
	1	1,45 <sup>Aab</sup>	1,38 <sup>Aa</sup>
	2	1,79 <sup>Ab</sup>	0,67 <sup>Ba</sup>
	3	0,76 <sup>Aa</sup>	0,66 <sup>Aa</sup>
	4	1,05 <sup>Aab</sup>	0,56 <sup>Aa</sup>
<b>E/E'L</b>	0	11,48 <sup>Aa</sup>	6,49 <sup>Bab</sup>
	1	9,58 <sup>Aa</sup>	5,21 <sup>Bb</sup>
	2	9,96 <sup>Aa</sup>	7,99 <sup>Aac</sup>
	3	10,17 <sup>Aa</sup>	7,66 <sup>Aac</sup>
	4	9,11 <sup>Aa</sup>	11,82 <sup>Ac</sup>

Onde: E'/E'L: velocidade diastólica precose da parede livre do VE em corte transversal e apical na altura do anel mitral; A'/A'L: velocidade diastólica tardia da parede livre do VE em corte transversal e apical na altura do anel mitral; E'/A' e E'L/A'L: relação das ondas E'/A' da parede livre do VE em corte transversal e apical na altura do anel mitral

Teste de Tukey, adotando-se nível de significância de 5%. Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença entre tratamentos, letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença entre tempos, dentro do mesmo tratamento.

S: semana de tratamento. Valores em vermelho indicam diferença entre tratamentos

### 3.2.5 Mensuração da pressão arterial

A pressão arterial sistólica mensurada por meio do método Doppler não foi diferente entre os distintos tratamentos, tampouco entre os momentos dentro do mesmo tratamento. Já a pressão arterial sistólica mensurada por meio de método oscilométrico, foi maior nos animais do grupo B na primeira e quarta semanas do tratamento. As pressões arteriais diastólica e média foram maiores nos animais do grupo B, na quarta semana do tratamento (Tabela 8).

TABELA 6 - Valores das médias de pressão arterial aferida por método Doppler (PAS Doppler) e oscilométrico (PS, PD e PAM) em coelhos Nova Zelândia, machos, adultos, submetidos a tratamento com LASSBio 294 (A) ou controle positivo pimobendana (B), após o período de indução da cardiomiopatia dilatada (CMD) com doxorubicina e submetidos a avaliações semanais (S0, S1, S2, S3, S4). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016).

Variável	S	Tratamento	
		A	B
<b>PAS Doppler mmHg</b>	0	91,99 <sup>Aa</sup>	91,33 <sup>Aa</sup>
	1	92,57 <sup>Aa</sup>	83,11 <sup>Aa</sup>
	2	94,66 <sup>Aa</sup>	86,19 <sup>Aa</sup>
	3	91,38 <sup>Aa</sup>	79,11 <sup>Aa</sup>
	4	92,31 <sup>Aa</sup>	92,22 <sup>Aa</sup>
<b>PAS mmHg</b>	0	125,81 <sup>Aa</sup>	129,67 <sup>Aa</sup>
	1	124,19 <sup>Aa</sup>	174,44 <sup>Ba</sup>
	2	164,23 <sup>Aa</sup>	147,11 <sup>Aa</sup>
	3	151,28 <sup>Aa</sup>	131,22 <sup>Aa</sup>
	4	123,08 <sup>Aa</sup>	174,77 <sup>Ba</sup>
<b>PAD mmHg</b>	0	75,61 <sup>Aa</sup>	85,11 <sup>Aa</sup>
	1	73,42 <sup>Aa</sup>	97,00 <sup>Aa</sup>
	2	89,33 <sup>Aa</sup>	84,33 <sup>Aa</sup>
	3	89,48 <sup>Aa</sup>	84,11 <sup>Aa</sup>
	4	66,01 <sup>Aa</sup>	104,66 <sup>Ba</sup>
<b>PAM mmHg</b>	0	92,76 <sup>Aa</sup>	101,88 <sup>Aa</sup>
	1	91,85 <sup>Aa</sup>	124,33 <sup>Aa</sup>
	2	113,00 <sup>Aa</sup>	108,22 <sup>Aa</sup>
	3	112,99 <sup>Aa</sup>	101,22 <sup>Aa</sup>
	4	85,65 <sup>Aa</sup>	139,00 <sup>Ba</sup>

Onde: PAS Doppler: pressão arterial sistólica mensurada por método Doppler; PAS: pressão arterial sistólica mensurada por método oscilométrico; PAD: pressão arterial diastólica mensurada por método oscilométrico; PAM: pressão arterial média mensurada por método oscilométrico

Teste de Tukey, adotando-se nível de significância de 5%. Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença entre tratamentos, letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença entre tempos, dentro do mesmo tratamento.

S: semana de tratamento. Valores em vermelho indicam diferença entre tratamentos

### 3.2.6 Avaliação radiográfica do tórax

A avaliação do tamanho do coração dos animais por meio do método VHS não revelou diferenças significativas entre os grupos, nem entre os distintos momentos, dentro do mesmo grupo (Tabela 7).

TABELA 7 - Valores das médias do VHS de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos, submetidos a tratamento com LASSBio 294 (A) ou controle positivo pimobendana (B), após o período de indução da cardiomiopatia dilatada (CMD) com doxorubicina e submetidos a avaliações semanais (S0, S1, S2, S3, S4). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016).

Variável	S	Tratamento	
		A	B
VHS Vértebras	0	8,07 <sup>Aa</sup>	8,16 <sup>Aa</sup>
	1	8,50 <sup>Aa</sup>	8,00 <sup>Aa</sup>
	2	8,64 <sup>Aa</sup>	8,00 <sup>Aa</sup>
	3	8,36 <sup>Aa</sup>	8,00 <sup>Aa</sup>
	4	8,46 <sup>Aa</sup>	7,83 <sup>Aa</sup>

Teste de Tukey, adotando-se nível de significância de 5%. Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença entre tratamentos, letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença entre tempos, dentro do mesmo tratamento.

A avaliação radiográfica pulmonar por outro lado, revelou algumas diferenças entre os grupos. Antes do início do tratamento, três (3/7) animais do grupo A apresentavam padrão intersticial e um (1/7) apresentava padrão vascular, enquanto quatro (4/6) dos animais do grupo B não apresentavam alterações pulmonares e dois (2/6) apresentavam padrão vascular.

Na primeira semana do tratamento, o padrão vascular foi detectado em dois animais do grupo A (2/7) e em quatro animais do grupo B (4/6). O padrão intersticial foi observado em dois animais do grupo A (2/7) e dois animais do grupo B (2/6).

Na segunda semana, foi visualizada efusão pleural em dois animais do grupo A, os quais ainda apresentavam padrão pulmonar intersticial e cardiomegalia, sugestiva de efusão pericárdica (Figura 7A e B). O padrão pulmonar intersticial isolado foi detectado em um animal do grupo A e em quatro animais do grupo B. Dois animais do grupo A apresentavam padrão vascular nesse mesmo momento e, dois do grupo A e dois do grupo B, ainda mantinham-se sem alterações pulmonares.

Na terceira semana do tratamento, um animal do grupo A e dois do grupo B, não apresentavam alterações pulmonares. O padrão vascular foi detectado em dois animais do grupo A, já o intersticial foi visualizado em quatro animais do grupo B e dois do grupo A, sendo ainda detectada efusão pleural discreta e cardiomegalia em um desses animais.



Na quarta semana de tratamento, dois animais do grupo A e dois do grupo B não apresentavam alterações pulmonares. O padrão vascular foi visualizado em um animal do grupo A e o intersticial em dois animais do grupo A e quatro animais do grupo B. A efusão pleural não mais foi visualizada no coelho do grupo A, nesse momento.

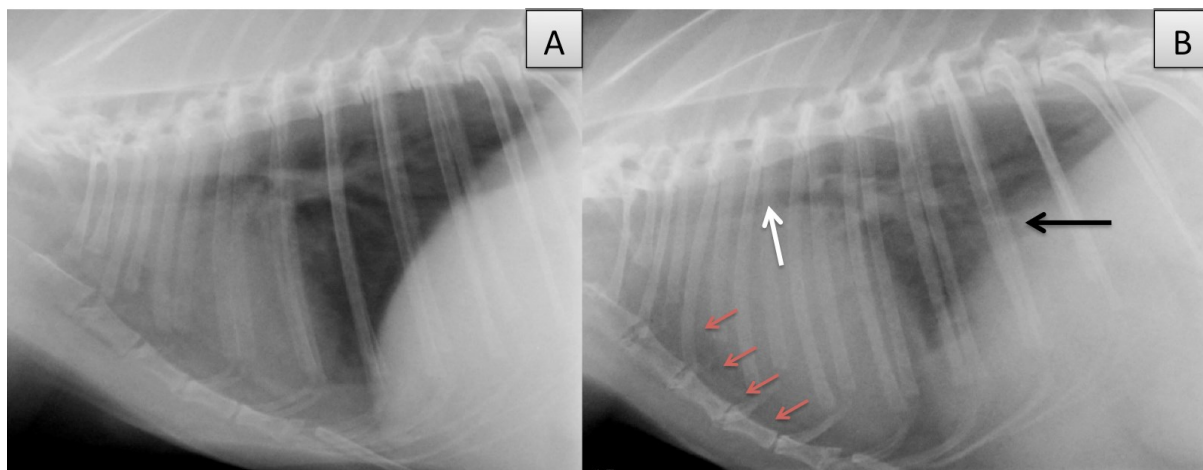


FIGURA 7: Radiografia em projeção laterolateral direita de coelho Nova Zelândia antes da indução da cardiomiopatia dilatada (A) e duas semanas após desenvolvimento da insuficiência sistólica (B) e tratado com LASSBio-294 (2mg/Kg). Nota-se aumento da radiopacidade pulmonar em B, caracterizando padrão intersticial difuso, sugerindo presença de edema pulmonar e deslocamento dorsal da traqueia (seta branca), devido à cardiomegalia generalizada, com aumento do contato do coração ao esterno (setas vermelhas), ainda percebe-se separação de lobos pulmonares, assumindo aspecto de folha, característico de efusão pleural (seta preta).

### 3.2.7 Avaliação hematológica e bioquímica

Os valores hematimétricos, referentes à série vermelha, dos coelhos do grupo A não apresentaram variações significativas nos diferentes momentos de avaliação, porém o hematócrito dos animais desse grupo foi maior que o do grupo B, na primeira semana de tratamento. Os animais do grupo B apresentaram variações significativas nos diferentes momentos, em relação ao número de hemácias e a concentração de hemoglobina, apresentando aumento gradual dos valores e diferença significativa em relação a S0, nos momentos S3 e S4 respectivamente. As demais variáveis da série vermelha não alteraram significativamente entre os tratamentos, tampouco entre os momentos dos diferentes tratamentos (Tabela 8).

TABELA 8 - Valores das médias dos parâmetros hematológicos (eritrograma) de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos, submetidos a tratamento com LASSBio 294 (A) ou controle positivo pimobendana (B), após o período de indução da cardiomiopatia dilatada (CMD) com doxorrubicina e submetidos a avaliações semanais (S0, S1, S2, S3, S4). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016).

Variável	S	Tratamento	
		A	B
<b>Hematócrito (%)</b>	0	43,72 <sup>Aa</sup>	40,36 <sup>Aa</sup>
	1	49,17 <sup>Aa</sup>	41,23 <sup>Ba</sup>
	2	43,17 <sup>Aa</sup>	42,70 <sup>Aa</sup>
	3	46,34 <sup>Aa</sup>	45,93 <sup>Aa</sup>
	4	49,30 <sup>Aa</sup>	47,30 <sup>Aa</sup>
<b>Hemácias (g/dL)</b>	0	6,02 <sup>Aa</sup>	5,78 <sup>Aa</sup>
	1	6,02 <sup>Aa</sup>	5,94 <sup>Aab</sup>
	2	6,03 <sup>Aa</sup>	6,13 <sup>Aab</sup>
	3	6,28 <sup>Aa</sup>	6,49 <sup>Aab</sup>
	4	6,71 <sup>Aa</sup>	6,77 <sup>Ab</sup>
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	0	13,98 <sup>Aa</sup>	13,33 <sup>Aa</sup>
	1	14,45 <sup>Aa</sup>	13,60 <sup>Aab</sup>
	2	13,98 <sup>Aa</sup>	13,70 <sup>Aab</sup>
	3	15,16 <sup>Aa</sup>	15,26 <sup>Ab</sup>
	4	15,74 <sup>Aa</sup>	15,30 <sup>Ab</sup>
<b>VCM (tL)</b>	0	72,68 <sup>Aa</sup>	69,89 <sup>Aa</sup>
	1	83,22 <sup>Aa</sup>	69,38 <sup>Aa</sup>
	2	71,71 <sup>Aa</sup>	69,68 <sup>Aa</sup>
	3	73,13 <sup>Aa</sup>	70,86 <sup>Aa</sup>
	4	73,04 <sup>Aa</sup>	69,93 <sup>Aa</sup>
<b>HCM (g/dL)</b>	0	23,23 <sup>Aa</sup>	23,07 <sup>Aa</sup>
	1	23,99 <sup>Aa</sup>	22,89 <sup>Aa</sup>
	2	23,26 <sup>Aa</sup>	22,36 <sup>Aa</sup>
	3	24,30 <sup>Aa</sup>	23,58 <sup>Aa</sup>
	4	23,61 <sup>Aa</sup>	22,63 <sup>Aa</sup>
<b>CHCM (pg)</b>	0	31,96 <sup>Aa</sup>	33,03 <sup>Aa</sup>
	1	30,81 <sup>Aa</sup>	32,96 <sup>Aa</sup>
	2	32,42 <sup>Aa</sup>	32,09 <sup>Aa</sup>
	3	33,39 <sup>Aa</sup>	33,27 <sup>Aa</sup>
	4	32,49 <sup>Aa</sup>	32,32 <sup>Aa</sup>
<b>Plaquetas (giga/L)</b>	0	306,85 <sup>Aa</sup>	208,00 <sup>Aa</sup>
	1	300,00 <sup>Aa</sup>	278,00 <sup>Aa</sup>
	2	306,42 <sup>Aa</sup>	292,66 <sup>Aa</sup>
	3	390,34 <sup>Aa</sup>	296,00 <sup>Aa</sup>
	4	372,54 <sup>Aa</sup>	330,00 <sup>Aa</sup>

Teste de Tukey, adotando-se nível de significância de 5%. Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença entre tratamento, letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença entre tempos, dentro do mesmo tratamento.

S: semana de tratamento. Valores em vermelho indicam diferença entre tratamentos



Em relação ao leucograma não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos, nem dentro dos tratamentos, nos diferentes momentos, exceto o número de eosinófilos dos coelhos do grupo B que caiu significativamente em relação ao tempo zero, nas três primeiras semanas de tratamento e voltou a ser semelhante ao do tempo zero, em S4 (Tabela 9).

TABELA 9 - Valores das médias dos parâmetros hematológicos (leucograma) de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos, submetidos a tratamento com LASSBio 294 (A) ou controle positivo pimobendana (B), após o período de indução da cardiomiopatia dilatada (CMD) com doxorrubicina e submetidos a avaliações semanais (S0, S1, S2, S3, S4). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016).

Variável	S	Tratamento	
		A	B
<b>Leucócitos Totais</b> (/mm <sup>3</sup> )	0	3557,14 <sup>Aa</sup>	4000,00 <sup>Aa</sup>
	1	3900,00 <sup>Aa</sup>	3700,00 <sup>Aa</sup>
	2	4342,85 <sup>Aa</sup>	3966,66 <sup>Aa</sup>
	3	4380,00 <sup>Aa</sup>	3966,66 <sup>Aa</sup>
	4	4220,00 <sup>Aa</sup>	4533,33 <sup>Aa</sup>
<b>Heterófilos</b> (/mm <sup>3</sup> )	0	1316,00 <sup>Aa</sup>	1810,66 <sup>Aa</sup>
	1	1612,42 <sup>Aa</sup>	1527,00 <sup>Aa</sup>
	2	1980,57 <sup>Aa</sup>	1619,66 <sup>Aa</sup>
	3	1988,28 <sup>Aa</sup>	1607,00 <sup>Aa</sup>
	4	2059,48 <sup>Aa</sup>	2276,66 <sup>Aa</sup>
<b>Eosinófilos</b> (/mm <sup>3</sup> )	0	154,28 <sup>Aa</sup>	220,66 <sup>Aa</sup>
	1	94,71 <sup>Aa</sup>	37,00 <sup>Ab</sup>
	2	95,71 <sup>Aa</sup>	64,33 <sup>Ab</sup>
	3	145,74 <sup>Aa</sup>	68,66 <sup>Ab</sup>
	4	95,14 <sup>Aa</sup>	115,33 <sup>Aab</sup>
<b>Linfócitos típicos</b>	0	1680,00 <sup>Aa</sup>	1770,66 <sup>Aa</sup>
	1	1840,00 <sup>Aa</sup>	1987,33 <sup>Aa</sup>
	2	1871,85 <sup>Aa</sup>	1990,66 <sup>Aa</sup>
	3	1887,99 <sup>Aa</sup>	2054,66 <sup>Aa</sup>
	4	1734,39 <sup>Aa</sup>	1765,33 <sup>Aa</sup>
<b>Monócitos</b> (/mm <sup>3</sup> )	0	306,85 <sup>Aa</sup>	198,00 <sup>Aa</sup>
	1	352,85 <sup>Aa</sup>	148,66 <sup>Aa</sup>
	2	394,71 <sup>Aa</sup>	281,00 <sup>Aa</sup>
	3	349,63 <sup>Aa</sup>	236,33 <sup>Aa</sup>
	4	322,63 <sup>Aa</sup>	376,00 <sup>Aa</sup>

Teste de Tukey, adotando-se nível de significância de 5%. Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença entre tratamento, letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença entre tempos, dentro do mesmo tratamento.

S: semana de tratamento

TABELA 10 – Valores das médias da avaliação bioquímica sérica das enzimas ALT, AST, ALP, LDH, CK e CK<sub>MB</sub> e das concentrações de albumina, proteína plasmática, uréia, creatinina, fósforo, potássio e cálcio de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos, submetidos a tratamento com LASSBio 294 (A) ou controle positivo pimobendana (B), após o período de indução da cardiomiopatia dilatada (CMD) com doxorubicina e submetidos a avaliações semanais (S0, S1, S2, S3, S4). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016).

Variável	S	Tratamento	
		A	B
Albumina (g/dL)	0	2,87 <sup>Aa</sup>	1,68 <sup>Ba</sup>
	1	2,53 <sup>Aa</sup>	1,72 <sup>Aa</sup>
	2	2,60 <sup>Aa</sup>	1,79 <sup>Aa</sup>
	3	2,53 <sup>Aa</sup>	2,30 <sup>Aa</sup>
	4	2,95 <sup>Aa</sup>	2,36 <sup>Aa</sup>
ALT (U/L)	0	31,61 <sup>Aa</sup>	16,09 <sup>Aa</sup>
	1	29,24 <sup>Aa</sup>	26,20 <sup>Aab</sup>
	2	33,71 <sup>Aa</sup>	27,81 <sup>Aab</sup>
	3	38,81 <sup>Aa</sup>	49,41 <sup>Ab</sup>
	4	43,59 <sup>Aa</sup>	50,18 <sup>Ab</sup>
ALP (U/L)	0	37,64 <sup>Aa</sup>	29,51 <sup>Aa</sup>
	1	45,34 <sup>Aa</sup>	35,51 <sup>Aa</sup>
	2	46,15 <sup>Aa</sup>	28,75 <sup>Aa</sup>
	3	44,89 <sup>Aa</sup>	50,69 <sup>Aa</sup>
	4	51,40 <sup>Aa</sup>	54,46 <sup>Aa</sup>
Proteínas totais (g/dL)	0	4,88 <sup>Aa</sup>	3,54 <sup>Aa</sup>
	1	4,46 <sup>Aa</sup>	4,68 <sup>Aab</sup>
	2	4,57 <sup>Aa</sup>	4,70 <sup>Aab</sup>
	3	4,86 <sup>Aa</sup>	5,36 <sup>Aab</sup>
	4	5,09 <sup>Aa</sup>	5,67 <sup>Ab</sup>
Ureia (mg/dL)	0	29,90 <sup>Aa</sup>	34,73 <sup>Aa</sup>
	1	33,81 <sup>Aa</sup>	34,66 <sup>Aa</sup>
	2	33,00 <sup>Aa</sup>	31,64 <sup>Aa</sup>
	3	33,67 <sup>Aa</sup>	34,93 <sup>Aa</sup>
	4	30,05 <sup>Aa</sup>	32,09 <sup>Aa</sup>
Creatinina (mg/dL)	0	1,35 <sup>Aa</sup>	1,64 <sup>Aab</sup>
	1	1,26 <sup>Aa</sup>	1,26 <sup>Aab</sup>
	2	1,25 <sup>Aa</sup>	1,69 <sup>Aa</sup>
	3	0,89 <sup>Aa</sup>	1,67 <sup>Ba</sup>
	4	0,74 <sup>Aa</sup>	0,82 <sup>Ab</sup>
AST (U/L)	0	33,21 <sup>Aab</sup>	28,90 <sup>Aab</sup>
	1	38,73 <sup>Aab</sup>	30,57 <sup>Aab</sup>
	2	27,95 <sup>Aa</sup>	32,12 <sup>Aab</sup>
	3	32,92 <sup>Aab</sup>	77,04 <sup>Ba</sup>
	4	80,39 <sup>Ab</sup>	27,53 <sup>Bb</sup>
LDH (U/L)	0	370,30 <sup>Aa</sup>	441,13 <sup>Aa</sup>
	1	419,14 <sup>Aa</sup>	597,96 <sup>Aa</sup>
	2	752,68 <sup>Aa</sup>	528,10 <sup>Aa</sup>
	3	397,39 <sup>Aa</sup>	601,96 <sup>Aa</sup>
	4	675,81 <sup>Aa</sup>	449,93 <sup>Aa</sup>

TABELA 10 – Valores das médias da avaliação bioquímica sérica das enzimas ALT, AST, ALP, LDH, CK e CKMB e das concentrações de albumina, proteína plasmática, uréia, creatinina, fósforo, potássio e cálcio de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos, submetidos a tratamento com LASSBio 294 (A) ou controle positivo pimobendana (B), após o período de indução da cardiomiopatia dilatada (CMD) com doxorubicina e submetidos a avaliações semanais (S0, S1, S2, S3, S4). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016). (Continuação)

Variável	S	Tratamento	
		A	B
CK (U/L)	0	1210,4 <sup>Aa</sup>	3442,3 <sup>Aa</sup>
	1	1562,9 <sup>Aa</sup>	3130,3 <sup>Aa</sup>
	2	3698,3 <sup>Aa</sup>	1553,3 <sup>Aa</sup>
	3	1713,8 <sup>Aa</sup>	2882,0 <sup>Aa</sup>
	4	2673,8 <sup>Aa</sup>	1422,7 <sup>Aa</sup>
CK <sub>MB</sub> (U/L)	0	344,31 <sup>Aa</sup>	320,23 <sup>Aa</sup>
	1	265,75 <sup>Aa</sup>	532,60 <sup>Aa</sup>
	2	383,37 <sup>Aa</sup>	587,70 <sup>Aa</sup>
	3	387,33 <sup>Aa</sup>	482,66 <sup>Aa</sup>
	4	701,84 <sup>Aa</sup>	510,13 <sup>Aa</sup>
Fósforo (mg/dL)	0	3,41 <sup>Aa</sup>	2,08 <sup>Ba</sup>
	1	3,91 <sup>Aa</sup>	2,08 <sup>Ba</sup>
	2	3,51 <sup>Aa</sup>	2,01 <sup>Ba</sup>
	3	3,35 <sup>Aa</sup>	1,30 <sup>Ba</sup>
	4	3,30 <sup>Aa</sup>	2,43 <sup>Aa</sup>
Potássio (mEq/L)	0	4,05 <sup>Aa</sup>	4,82 <sup>Aa</sup>
	1	4,20 <sup>Aa</sup>	4,87 <sup>Aa</sup>
	2	4,36 <sup>Aa</sup>	4,28 <sup>Aa</sup>
	3	4,31 <sup>Aa</sup>	4,60 <sup>Aa</sup>
	4	4,72 <sup>Aa</sup>	4,75 <sup>Aa</sup>
Cálcio (mg/dL)	0	13,30 <sup>Aa</sup>	14,48 <sup>Aab</sup>
	1	14,34 <sup>Aa</sup>	13,41 <sup>Aa</sup>
	2	14,51 <sup>Aa</sup>	16,41 <sup>Aab</sup>
	3	14,31 <sup>Aa</sup>	16,11 <sup>Aab</sup>
	4	14,70 <sup>Aa</sup>	16,90 <sup>Ab</sup>

Onde: ALT: alanina aminotransferase; ALP: fosfatase alcalina; AST: aspartato aminotransferase; LDH: lactato desidrogenase; CK: creatina quinase; CK<sub>MB</sub>: creatina quinase fração do miocárdio  
 Teste de Tukey, adotando-se nível de significância de 5%. Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença entre tratamento, letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença entre tempos, dentro do mesmo tratamento.

S: semana de tratamento. Valores em vermelho indicam diferença entre tratamentos

As variáveis bioquímicas ALT, ALP, proteínas totais, uréia, LDH, CK, CK<sub>MB</sub>, potássio e cálcio não foram diferentes entre os tratamentos A e B. A concentração de albumina foi maior nos animais do grupo A no momento S0. A creatinina foi significativamente menor nos animais do grupo A, na terceira semana de avaliação e reduziu significativa no grupo B, em relação ao valor basal do grupo, na quarta semana de tratamento

(Figura 8). A AST aumentou gradativamente em ambos os grupos, sendo maior no grupo A na quarta semana e maior no grupo B, na terceira semana. O fósforo foi significativamente maior nos animais do grupo A, nos momentos S0, S1, S2 e S3. A atividade sérica da ALT e as proteínas totais dos animais do grupo B aumentaram significativamente nos momentos S3 e S4, para a variável ALT e S4, para a variável proteínas plasmáticas. Apesar dos valores de cálcio não terem sido diferentes entre os grupos, houve variação significativa de sua concentração dentro do grupo B, sendo o maior valor obtido na última semana de avaliação. As demais variáveis não modificaram significativamente ao longo do tempo, dentro dos distintos tratamentos.

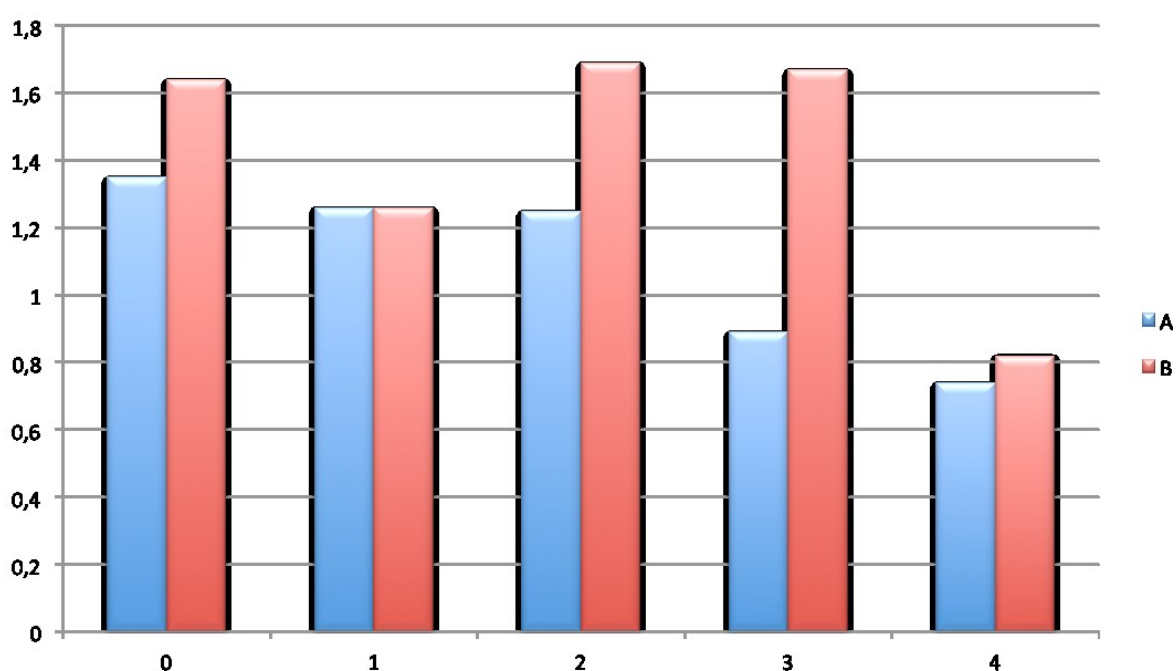


FIGURA 8 – Representação gráfica da concentração sérica de creatinina de coelhos submetidos a indução da CMD por doxorrubina e tratados com LASSBio 294 (2mg/Kg) (A) ou pimobendana (0,3mg/Kg) (B). Nota-se redução da concentração sérica de creatinina do grupo A a partir da terceira semana de tratamento, enquanto no grupo B essa redução somente foi observada na quarta semana de tratamento.

### 3.2.7 Avaliação anatomopatológica

Os dois coelhos do grupo A que morreram durante o tratamento apresentavam alterações compatíveis com ICC à avaliação macroscópica, quais sejam: efusão abdominal, congestão hepática, congestão renal, efusão pleural e efusão pericárdica (Figura 9). Um deles ainda apresentou sangue em lúmen traqueal. O outro animal, que desenvolveu efusão pleural, apresentava congestão pulmonar e edema pulmonar, aumento de átrio esquerdo e direito e fibrose miocárdica.

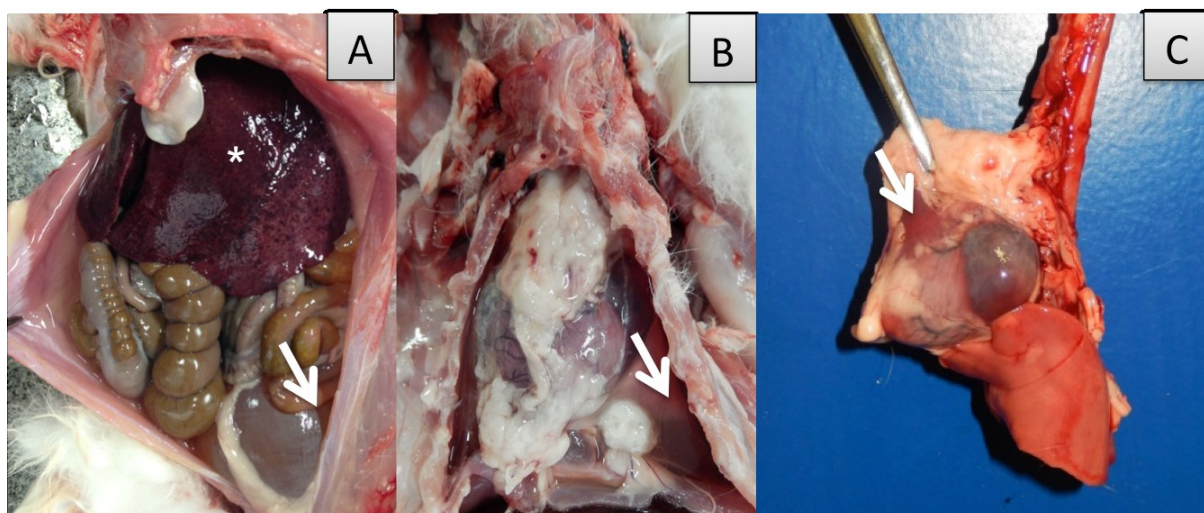


FIGURA 9: Alterações macroscópicas observadas em coelhos Nova Zelândia após indução da CMD por doxorubicina e tratados com LASSBio 294. Em A: Nota-se congestão hepática (asterisco) e efusão abdominal (seta). Em B: Nota-se efusão pleural (seta) e, em C, efusão pericárdica (seta).

Os demais coelhos do grupo A (4/7) apresentaram áreas compatíveis com fibrose miocárdica, sendo verificado discreto hidropericárdio em dois animais e um destes ainda apresentava congestão pulmonar.

Dois animais do grupo B (2/6) apresentavam congestão hepática, aumento de ventrículo direito e áreas de fibrose miocárdica. Os outros quatro coelhos do grupo apresentaram lesões compatíveis com fibrose no miocárdio.

Além da avaliação macroscópica, foram mensurados o peso coração, o peso dos animais, a relação peso do coração/peso corpóreo e a extensão dos eixos cardíacos horizontal e vertical (Figura 10). Contudo, não foram encontradas diferenças para tais variáveis entre os grupos (Tabela 11), tampouco quando os dados foram comparados com um grupo de animais saudáveis (Grupo C, n=6).

TABELA 11 - Valores das médias do peso do coração, peso corpóreo, relação peso corpóreo/coração e medidas do coração em eixo longo e curto de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos, submetidos a tratamento com LASSBio 294 (A) e controle positivo pimobendana (B) após o período de indução da cardiomiopatia dilatada (CMD) com doxorubicina e grupo de animais saudáveis (C). EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016).

Variável	Tratamento		
	A	B	C
Peso coração (g)	10,74 <sup>a</sup>	7,07 <sup>a</sup>	7,01 <sup>a</sup>
Peso corpóreo (g)	3.210 <sup>a</sup>	2.860 <sup>a</sup>	2.685 <sup>a</sup>
Coração/Peso	0,0034 <sup>a</sup>	0,0027 <sup>a</sup>	0,0025 <sup>a</sup>
Eixo longo (cm)	3,78 <sup>a</sup>	3,58 <sup>a</sup>	3,03 <sup>a</sup>
Eixo curto (cm)	2,72 <sup>a</sup>	2,42 <sup>a</sup>	2,22 <sup>a</sup>

Teste de Tukey, adotando-se nível de significância de 5%. Letras iguais indicam que não houve diferença entre tratamentos

À avaliação histopatológica do miocárdio foram encontradas as seguintes alterações: edema e fibrose intersticial, fragmentação das miofibrilas, vacuolização citoplasmática e necrose de cardiomiócitos (Figuras 11 e 12). Entretanto, não houve diferença entre os grupos em relação às alterações microscópicas (Tabela 12).

TABELA 12 - Valores das médias dos escores das variáveis histopatológicas de coelhos Nova Zelândia machos, adultos, submetidos a tratamento com LASSBio 294 (A) ou controle positivo, pimobendana (B), após o período de indução da cardiomiopatia dilatada (CMD) com doxorubicina. EVZ, UFG, Goiânia, GO (2016).

Variável	Tratamento	
	A	B
<b>Edema intersticial</b>	1,00 <sup>a</sup>	1,33 <sup>a</sup>
<b>Fragmentação de miofibrilas</b>	2,28 <sup>a</sup>	2,66 <sup>a</sup>
<b>Vacuolização</b>	1,85 <sup>a</sup>	2,00 <sup>a</sup>
<b>Necrose</b>	2,28 <sup>a</sup>	2,33 <sup>a</sup>
<b>Fibrose</b>	2,00 <sup>a</sup>	2,33 <sup>a</sup>

Teste de Kruskal-Wallis, adotando-se nível de significância de 5%. Letras iguais indicam que não houve diferença entre tratamento.



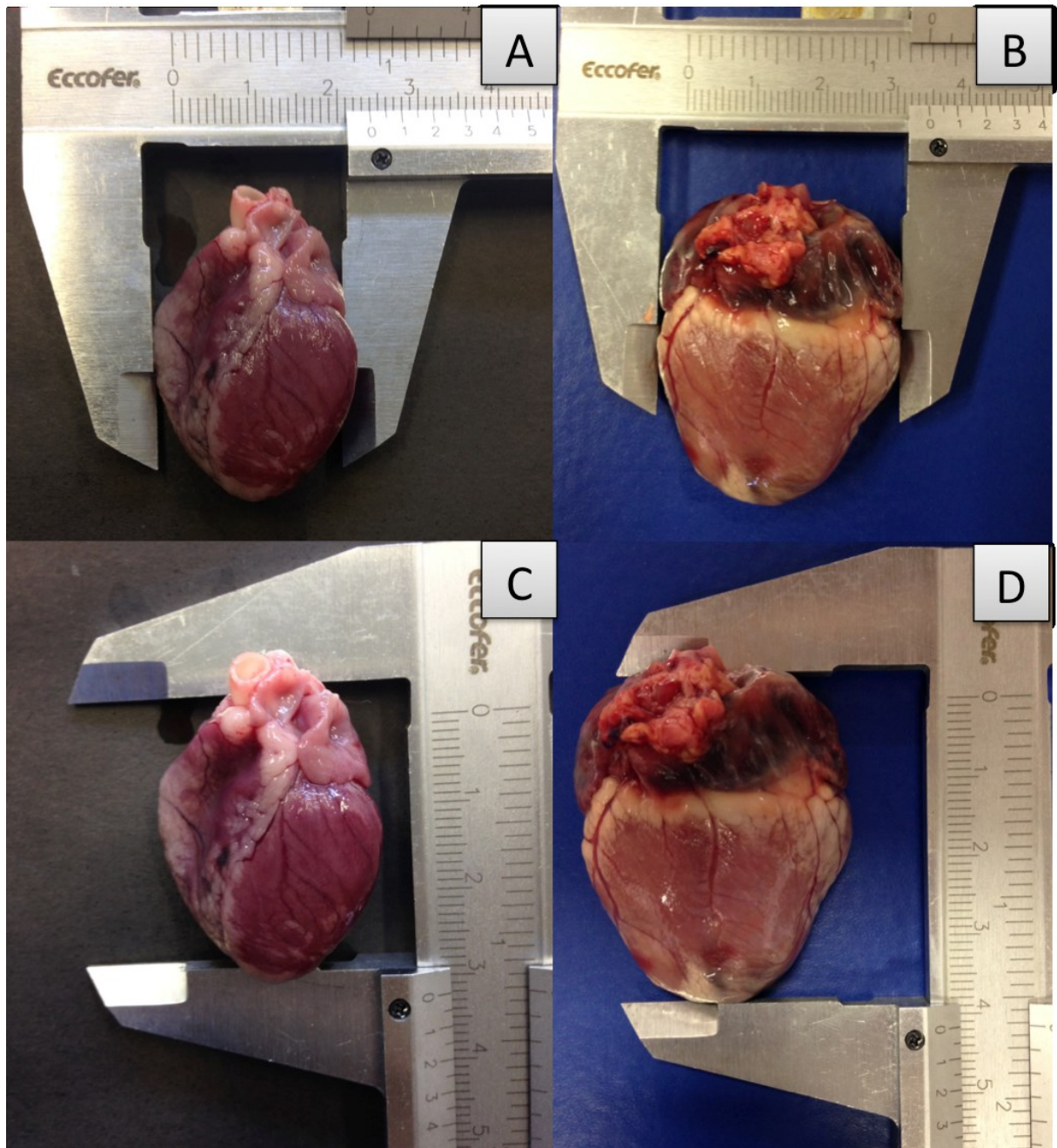


FIGURA 10: Corações de coelhos Nova Zelândia saudável (A e C) e após indução da CMD por doxorubicina e tratados com LASSBio 294 (B e D). Em A e B, corações medidos em eixo curto. Em C e D, corações medidos em eixo longo. Em B e D, nota-se cardiomegalia, caracterizando CMD.

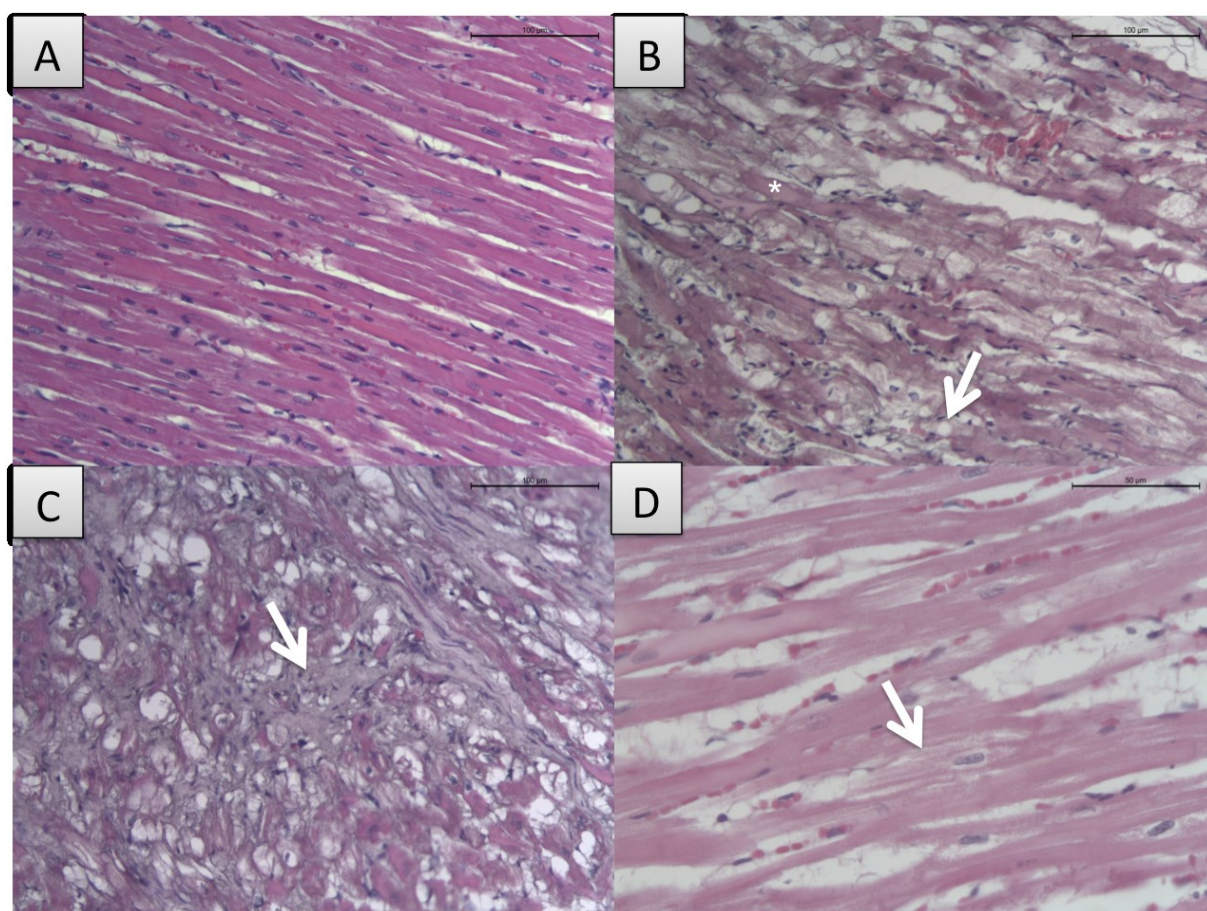


FIGURA 11: Fotomicrografias de tecido cardíaco de coelhos Nova Zelândia saudável (A) e submetidos a indução da CMD por doxorrubina e tratados com LASSBio 294 (2mg/Kg) (D) ou pimobendana (0,3mg/Kg) (B e C). B: Vacuolização de cardiomiócitos (seta) e necrose (asterisco). C: Fibrose intersticial (seta). D: Fragmentação de cardiomiócitos (seta). Hematoxilina e Eosina. Objetiva: 20x (A, B e C) e 40x (D).



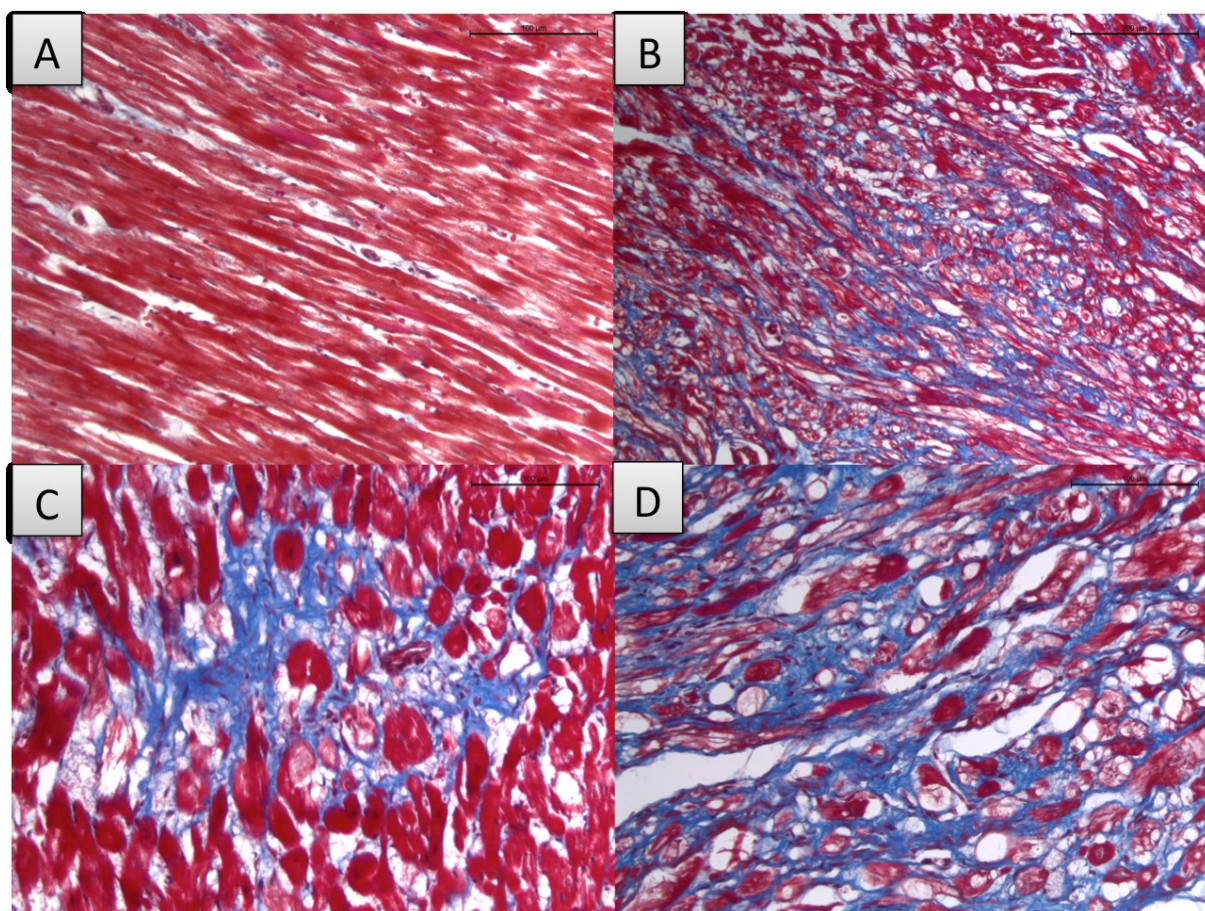


FIGURA 12: Fotomicrografias de tecido cardíaco de coelhos Nova Zelândia saudável (A) e submetidos a indução da CMD por doxorubicina e tratado com pimobendana (0,3mg/Kg) (B, C e D). Em B, C e D: Nota-se evidência da fibrose intersticial pela coloração do Tricrômico de Masson. Objetiva: 20x (A) e 40x (B,C e D).

#### 4. DISCUSSÃO

Previamente ao estudo que avaliaria a ação do LASSBio 294 em coelhos com CMD induzida por doxorubicina, foi realizado um estudo piloto com o intuito de elucidar a farmacocinética do composto na espécie leporina. O pico máximo de concentração plasmática do LASSBio 294 ocorreu quatro horas após a administração do composto aos coelhos, enquanto nos cães o pico máximo foi observado uma hora depois. A meia vida plasmática do protótipo foi maior no coelho, porém a concentração máxima foi menor. No entanto, assim como no cão, observou-se que a concentração plasmática do composto decaiu rapidamente após o pico máximo de sua concentração, indicando eliminação rápida<sup>6</sup>.

Os metabólitos gerados também foram diferentes entre as espécies, enquanto no cão foram identificados um sulfóxido e um hidroxilado<sup>27</sup>, no coelho foram identificados os metabólitos 3,4-dihidroxibenzohidrazida e 1,3-benzodioxoico. Outros pesquisadores identificaram o 3,4-dihidroxibenzohidrazida com sendo o único metabólito derivado do

LASSBio 294 em bioensaios utilizando fígado de ratos. Ainda identificaram que a isoforma CYP1A2 do citocromo P450 está envolvida no metabolismo do composto em roedores e humanos<sup>28</sup>. Isso levanta a questão de que provavelmente outra isoforma do citocromo P450 esteja envolvida no metabolismo do LASSBio 294 em cães e por isso houve a formação de metabólitos diferentes. Porém, em nenhuma das espécies, canina<sup>6,27</sup> ou leporina, foram observados sinais, no decorrer dos estudos farmacocinéticos, que pudessem ser atribuídos à toxicidade do composto ou de seus metabólitos.

Quando o LASSBio 294 foi administrado aos animais com CMD induzida por doxorrubicina, foi observada taxa de mortalidade de 28,57% no grupo, ao passo que não foram verificados óbitos no grupo tratado com pimobendana. Vale ressaltar que os animais morreram devido a complicações da CMD, apresentando sinais compatíveis com IC e não alterações indicativas de toxicidade induzida pelo composto. Em estudos empregando a pimobendana em cães portadores de cardiomiopatia dilatada, foi demonstrado que este fármaco aumenta a sobrevida dos animais, desacelerando a progressão da insuficiência cardíaca<sup>29</sup>.

As alterações à avaliação clínica e posteriormente os achados necroscópicos, foram compatíveis com IC em ambos os grupos<sup>30</sup>, porém foram mais graves nos animais tratados com LASSBio 294, visto que estes apresentaram efusões abdominal, pleural e pericárdica, além de congestão hepática e renal, ao passo que os animais do grupo pimobendana apresentaram somente edema testicular e congestão hepática. Assim é possível que a pimobendana apresente melhor desempenho em retardar a progressão da insuficiência cardíaca em coelhos com CMD induzida por doxorrubicina, porém não evitou que as lesões miocárdicas ocorressem, visto que à microscopia as alterações observadas foram semelhantes às do grupo tratado com LASSBio 294. Visto que as lesões provocadas pela doxorrubicina são progressivas e irreversíveis<sup>9,31</sup>, esperava-se que os tratamentos desacelerassem a progressão da IC e não que revertissem os danos estruturais no miocárdio.

Além de apresentarem lesões semelhantes à microscopia, o peso do coração e a relação peso do coração/peso corpóreo também foram semelhantes entre os grupos A e B, o que indica evolução semelhante do remodelamento cardíaco entre os grupos. Apesar de não ter sido verificada diferença, foi possível observar que o coração dos coelhos dos grupos A e B tinham dimensões em eixo horizontal e vertical maiores que as do grupo de coelhos saudáveis, sugerindo aumento do coração desses animais, compatível com CMD. Porém, ao contrário do observado por Bertinchant et al.<sup>32</sup> em ratos com CMD induzida por doxorrubicina, o peso dos corações não foi menor que aqueles dos animais saudáveis e isso

pode se dever ao fato de que houve dificuldade em proceder a retirada de todos os coágulos formados nas câmaras cardíacas, após a morte dos animais.

A avaliação eletrocardiográfica da ação do fármaco e do composto no sistema cardiovascular de coelhos com CMD induzida por doxorrubicina indicou aumento da duração do complexo QRS nos coelhos do grupo B, na terceira e quarta semanas, e aumento da amplitude da onda R em S1, quando comparados aos valores obtidos nos animais do grupo A, porém esses valores permaneceram dentro da normalidade para a espécie. O intervalo QT aumentou nos dois grupos, mas seu aumento foi significativo somente no grupo A, mas permaneceu dentro dos valores de normais para a espécie. Já amplitude da onda P, apesar de estar dentro dos valores normais para espécie, foi diferente estatisticamente entre os grupos em S4, sendo a maior média pertencente aos animais do grupo A<sup>14,16</sup>.

Apesar de manter-se dentro da faixa considerada normal para coelhos, houve redução significativa da frequência cardíaca (FC) dos animais tratados com pimobendana, o que difere do relatado por Van Meel & Dierderen<sup>33</sup>, que observaram aumento da FC de coelhos hígidos submetidos a ação do fármaco, sendo esse efeito dose dependente. Outro estudo comprovou que a pimobendana é capaz de aumentar a FC em cães normais, mas não de cães com IC induzida por taquicardia<sup>34</sup>. Em cães com doença mixomatosa valvular (DMV) e IC, a pimobendana diminuiu a FC dos animais e os autores atribuíram esse fato à uma resposta dos barorreceptores ao aumento do volume sistólico anterógrado<sup>35</sup>. A frequência cardíaca dos animais do grupo A por outro lado, não se modificou ao longo do tratamento e foi significativamente maior que a dos animais do grupo B, na quarta semana de tratamento.

Os complexos ventriculares prematuros estiveram presentes tanto no grupo tratado com LASSBio 294 como naqueles tratados com pimobendana, porém não foram observadas arritmias sustentadas em nenhum grupo, o que indica que nesses animais nenhum dos fármacos apresentou efeitos pró-arritmogênicos. Esse resultado deve ser interpretado com cautela, visto que foi comprovado que em cães com CMD as eletrocardiografias de cinco minutos são pouco sensíveis para identificar eventos arrítmicos, sendo o método realizado por Holter, em 24 horas, mais confiável<sup>36</sup>, porém devido a fragilidade da espécie frente a manipulações que possam provocar estresse, optou-se por não utilizar Holter nos coelhos deste estudo. A taquicardia atrial observada em três animais do grupo LASSBio 294 deveu-se a uma alteração estrutural do coração e não a um efeito pró-arrítmico do composto, uma vez que estes apresentavam sinais de IC e aumento do átrio esquerdo.

O tamanho do coração dos animais não foi diferente estatisticamente quando avaliados pelo método do VHS na radiografia torácica. Porém foi possível verificar, por meio

da ecocardiografia em modo-B, que o átrio esquerdo dos animais aumentou ao longo do estudo, sendo esse aumento significativo no grupo A, mas não apresentou diferença em relação aos animais do grupo B. Também observou-se aumento da relação AE/Ao nos animais do grupo A, porém sem diferença estatística, indicando que o tratamento não impediu a progressão da doença. Porém os animais do grupo B apresentaram aumento do diâmetro da aorta, sendo esse diâmetro maior e diferente estatisticamente dos animais do grupo A no momento S4, o qual pode ser atribuído à vasodilatação induzida pelo fármaco<sup>33</sup>, o que pode ter contribuído para achados de relação AE/Ao menores nesse grupo.

Em relação aos parâmetros ecocardiográficos em modo-M, foi possível observar aumento da espessura da parede livre do VE em diástole e septo interventricular do VE em sístole, nos grupos B e A respectivamente, não sendo verificada diferenças entre os grupos. Essas diferenças estruturais no miocárdio de animais com ou sem cardiomiopatias, também foram observadas em outro estudo utilizando pimobendana<sup>37,38</sup>. Apesar do aumento de espessura do septo interventricular e parede livre do VE, observado nos dois grupos, ambos apresentavam valores abaixo da média considerada normal para a espécie<sup>16</sup>, caracterizando remodelamento e dilatação ventricular.

Também em modo-M foi possível observar diferenças entre os grupos em relação à variável DIVED, em S2, porém ambos os grupos apresentaram aumento dessa variável ao longo do tempo, sem no entanto apresentarem diferença estatística em relação aos valores obtidos no tempo basal, o que indica a progressão da doença em ambos os tratamentos. A progressão do remodelamento pode também ser verificada pelo achado de insuficiências valvulares em ambos os grupos, achado comum em pacientes portadores de CMD<sup>39</sup>. Vale ressaltar também que, apesar de não apresentarem diferenças estatísticas em relação aos valores do grupo B, os animais do grupo A, antes do início do tratamento, apresentavam valores DIVE em sístole e diástole superiores, o que pode ter contribuído para a diferença observada no momento S2, entre os dois grupos e também para progressão da IC nesse grupo.

O índice sistólico fração de ejeção não foi diferente entre os A e B, tampouco dentro dos tratamentos, apesar de que em ambos observou-se aumento progressivo desse índice até a terceira semana de tratamento. A fração de encurtamento aumentou em ambos os grupos, porém não foi observada diferença dentro do grupo B, mas dentro do grupo A essa apresentou aumento significativo na segunda semana de tratamento, sendo aproximadamente 35% maior em relação aos valores basais. Passos<sup>6</sup> ao estudar a ação do LASSBio 294 sobre os parâmetros cardiovasculares de cães Beagles saudáveis, verificou um incremento 13,1% na FE e 19,1% na FS, 24 horas após a administração do protótipo. Em ambos os grupos

observou-se redução dos índices sistólicos FE e FS na última semana de avaliação, mais uma vez comprovando a evolução da doença.

Os dois grupos apresentaram alterações sugestivas de disfunção diastólica porém, ao contrário dos animais do grupo B, os animais do grupo A mantiveram relação E/A mitral acima de um em todos os momentos, e os valores de  $E'/A'$  e  $E'L/A'L$  foram maiores que um em mais momentos do que o grupo B, sugerindo efeito lusitrópico do composto, o que também foi verificado em ratos submetidos ao infarto do miocárdio e tratados com LASSBio 294<sup>8</sup>.

Outro dado que corrobora para demonstrar o efeito lusitrópico do LASSBio 294 é a redução do tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) ao longo dos momentos experimentais, apresentando menor valor de TRIV no momento S4, quando comparado ao grupo pimobendana, o qual apresentava valor maior que o considerado normal para a espécie nesse momento<sup>21</sup>. Esse achado é diferente do reportado por alguns autores que relatam que a pimobendana induz diminuição do tempo de relaxamento e consequente efeito lusitrópico<sup>34,40</sup>, porém outros estudos com cães, com IC, tratados por tempo prolongado, identificaram hipertrofia do VE e disfunção diastólica como um efeito indesejável do fármaco<sup>41</sup>.

Os valores hemodinâmicos avaliados por meio do Doppler pulsado mantiveram-se dentro da normalidade<sup>16</sup>. No entanto, percebeu-se aumento do débito cardíaco e do volume sistólico em ambos os grupos, porém sem diferença estatística, o que, aliado ao achado de aumento de fração de ejeção e encurtamento, conduz à conclusão de que, tanto a pimobendana quanto o LASSBio 294 incrementaram a função sistólica dos animais com CMD induzida por doxorubicina.

Nenhum dos tratamentos promoveu hipotensão, o que demonstra segurança, apesar de Torres<sup>7</sup> ter comprovado que o LASSBio 294 promoveu diminuição da pressão arterial sistólica, com valores discretamente abaixo dos normais para espécie, em cães Beagles saudáveis. Os coelhos deste estudo, no entanto, estavam com CMD e em quadro de IC, situação em que o sistema renina antiotensina aldosterona encontra-se ativado<sup>30</sup>, e por esse motivo não era esperada queda significativa de pressão arterial. A pimobendana também não diminuiu a pressão arterial de gatos saudáveis ou com insuficiência cardíaca<sup>42,43</sup>, porém em coelhos saudáveis diminuiu a pressão diastólica e diminuiu a resistência vascular sistêmica<sup>33</sup>. Houve aumento da pressão sistólica, diastólica e média, aferida pelo método oscilométrico nos animais tratados com pimobendana neste estudo, na última avaliação e, a sistólica isolada, foi maior no grupo B no momento um, porém como o método não é o mais fidedigno para a espécie, não pode-se atribuir esses resultados aos efeitos do fármaco<sup>44</sup>.

A avaliação radiográfica do tórax dos animais revelou que nenhum dos tratamentos foi efetivo em prevenir o desenvolvimento de padrão intersticial, que está associado à presença de edema pulmonar. Porém, o quadro congestivo foi pior nos animais do grupo A, uma vez que esses apresentaram efusão pleural, também detectada por meio do ecocardiograma na segunda e terceira semanas de tratamento. Deve-se ressaltar que os animais do grupo A já apresentavam quadro congestivo antes do início do tratamento, sendo verificado padrão intersticial em três e vascular em um animal, ao passo que quatro animais do grupo B ainda não apresentam sinais de acúmulo de líquido no parênquima pulmonar e dois apresentavam apenas congestão dos vasos. Essa observação, aliada ao maior diâmetro interno do VE observado no coelhos do grupo A em S0, sugere que os animais do grupo A apresentavam-se em piores condições clínicas que os animais do grupo B, o que pode ter contribuído para a evolução mais rápida da IC e para os resultados observados nesse grupo, ressaltando um ponto negativo do sorteio aleatório que alocou os animais nos distintos grupos de tratamento.

A pimobendana mostrou ser eficiente em reduzir a recorrência do edema pulmonar em cães com doença mixomatosa valvular, porém quando utilizado em conjunto com tratamento preconizado para IC, qual seja: inibidores da enzima conversora da angiotensina (iECA) e diuréticos<sup>45</sup>. Isso levanta a hipótese de que, se associado ao tratamento padrão para IC, o LASSBio 294 e a pimobendana poderiam ter apresentado melhor performance.

Os valores eritrócitários não mudaram significativamente ao longo do estudo, a exceção do hematócrito do grupo A que foi maior que o do B em S1, e os valores de hemoglobina desse grupo que aumentaram gradativamente, sendo o valor obtido em S4, maior significativamente que antes do início do tratamento. A concentração de hemoglobina do grupo A também aumentou ao longo do tempo, porém não foi significativo à estatística. Sabe-se que a doxorrubicina é mielossupressora<sup>46,47</sup>, portanto a melhora dos valores eritrócitários dos animais deve-se a interrupção do protocolo de indução da CMD e não à ação do LASSBio 294 ou da pimobendana.

Os valores leucocitários também não se alteraram durante o período experimental, exceto os animais do grupo B que apresentaram redução significativa dos eosinófilos, nos momentos S1, S2 e S3. Porém, em todos eles, os valores permaneceram entre 0-5% dos leucócitos totais, estando dentro da normalidade para a espécie<sup>48</sup>. Os animais de ambos os grupos iniciaram os tratamentos apresentando leucopenia e não apresentaram melhora do

quadro, apesar da interrupção da administração da doxorrubicina, mas deve-se ressaltar que, nessa espécie, situações de estresse crônico provocam leucopenia<sup>49</sup>.

Em relação aos parâmetros bioquímicos, observou-se aumento gradual das enzimas hepáticas ALT, AST e ALP em ambos os grupos, o que pode ser atribuído a congestão hepática, porém sem ultrapassar os valores de referência para espécie<sup>48</sup>. Os animais do grupo B apresentavam hipoproteïnemia e hipoalbuminemia antes do início do tratamento, que poderiam indicar insulto hepático, porém foram apresentando aumento gradual dos valores. Apesar de raro, a perda de proteínas plasmáticas pode estar associada a doença renal em coelhos e, sabendo-se que a doxorrubicina tem potencial nefrotóxico nessa espécie, esse achado pode ser justificado portanto, pela suposta injúria renal que os animais apresentaram durante a indução, com melhora após a interrupção do quimioterápico e a associação de um medicamento com a ação inodilatadora, a pimobendana<sup>46,50</sup>.

A creatinina sérica, apesar de ter se mantido dentro dos valores normais para coelhos<sup>49</sup>, reduziu em ambos os tratamentos, porém no grupo A essa redução ocorreu precocemente, apresentando valor menor que o do grupo B em S3. Tanto a pimobendana quanto o LASSBio 294, promoveram melhora da função sistólica dos animais, o que consequentemente aumentou o volume sistólico e o débito cardíaco, melhorando a perfusão renal, assim como também constatado em um estudo envolvendo cães com DMV e medicados com pimobendana<sup>51</sup>.

O eletrólito potássio não apresentou variações significativas ao longo do estudo, permanecendo dentro dos valores reportados para a espécie nos dois grupos de animais avaliados. Porém observou-se hipofosfatemia no dois grupos, sendo essa mais pronunciada no grupo B, um achado que é considerado sem significado clínico para a espécie, mas pode estar associado à deficiência dietética ou má absorção intestinal<sup>49</sup>. Em pacientes portadores de CMD o edema de mucosa intestinal é comum, o que pode comprometer a absorção de nutrientes, o que explicaria a hipofosfatemia observada, porém os outros eletrólitos não apresentaram redução<sup>31</sup>.

Os valores de cálcio não foram diferentes entre os grupos no entanto, houve variação significativa de sua concentração dentro do grupo B, sendo o maior valor obtido na última semana de avaliação. Apesar de ter permanecido dentro do valor normal reportado para a espécie<sup>48</sup>, deve-se fazer alusão à hipótese de que o mecanismo de ação da pimobendana envolve o aumento da sensibilidade da tropomiosina ao cálcio<sup>52</sup>, enquanto o LASSBio 294 aumenta a mobilização do cálcio pelo retículo sarcoplasmático<sup>8</sup>, o que pode ter contribuído

para a menor concentração de cálcio no meio extracelular dos animais tratados com o protótipo.

Além da mensuração da atividade das enzimas para avaliar as funções renal e hepática dos animais, foram mensuradas também as atividades de enzimas de lesão cardíaca. Os valores obtidos de CK e LDH apresentaram grande variação ao longo do estudo, em ambos os grupos, sem significado à luz da estatística, porém ressalta-se que ambas são encontradas em outros tecidos, que não o cardíaco, e que podem se elevar devido a hemólise da amostra, no caso do LDH, ou devido a contenção física utilizada no momento da coleta, no caso da CK<sup>48,50,53</sup>. Já CK<sub>MB</sub> é mais específica para o miocárdio e aumentou ao longo do tempo, em ambos os grupos, porém sem significado estatístico, indicando que os tratamentos não preveniram a progressão da CMD induzida por doxorubicina, lembrando que essa é progressiva e irreversível<sup>9</sup>.

## 5. CONCLUSÕES

Assim, diante dos resultados obtidos, conclui-se que em coelhos saudáveis a concentração máxima do LASSBio 294 ocorre quatro horas após sua administração oral e que são produzidos dois metabólitos o 3,4-dihidroxibenzohidrazida e 1,3-benzodioxoico.

O LASSBio 294, na dose de 2mg/Kg, incrementa a função sistólica, melhora a função diastólica (efeito lusitrópico), não apresenta efeito pró arritmogênico e não altera a pressão arterial de coelhos com CMD induzida por doxorubicina.

O LASSBio 294, por seus efeitos vasculares, reduz a creatinina sérica. Os tratamentos não foram eficientes em retardar o desenvolvimento da insuficiência cardíaca para o modelo de indução utilizado.



## REFERÊNCIAS

1. Evora PRB, Nather JC, Rodrigues AJ. Prevalence of heart disease demonstrated in 60 years of the arquivos brasileiros de cardiologia. *Arq Bras Cardiol* 2014, 102(1):3-9.
2. Ziaeeian B, Fonarow GC. Epidemiology and aetiology of heart failure. *Nature* 2016, 13:368-378.
3. Sudo RT, Zapata-Sudo G, Barreiro EJ. The new compound, LASSBio 294, increases the contractility of intact and saponin-skinned cardiac muscle from Wistar rats. *Br J Pharmacol* 2001; 134:603-613.
4. Barreiro EJ. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. *Quim Nova* 2002; 25(6B):1172-1188.
5. Silva CLM, Noel F, Barreiro EJ. Cyclic GMP-dependent vasodilatory properties of LASSBio 294 in rat aorta. *Br J Pharmacol* 2002; . 135:293-298.
6. Passos ACBT. Avaliação clínica e farmacocinética de um novo protótipo de fármaco cardiotônico (LASSBio-294) em cães hígidos. [Tese]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia; 2012.
7. Torres ACB, Nasciutti PR, Brasil RCOL, Oliveira PN, Souza MC, Bittar IP, De Oliveira V, Barreiro EJ, Oliveira Alves R. The action of a new prototype cardiotonic drug (Lassbio 294) on the cardiovascular system of dogs. *ACVIM 2012 Forum Proceedings. Cardiology Research & Review. New Orleans: J Vet Int Med*; 2012. 26:193-195.
8. Costa DG, Silva JS, Kummerle A, Sudo RT, Landgraf SS, Caruso-Neves C, Fraga CAM, Barreiro EJJ, Zapata-Sudo G. LASSBio 294, a compound with inotropic and lusitropic activity, decreases cardiac remodeling and improves  $Ca^{2+}$  influx into sarcoplasmic reticulum after myocardial infarction. *Am J Hypertens* 2010; 23(11):1220-1227.
9. Houser SR, Margulies KB, Murphy AM, Spinale FG, Francis GS, Prabhu SD, Rockman HA, Kass DA, Molkentin JD, Sussman MA, Koch WJ. Animal models of heart failure: a scientific statement from the american heart association. *Circ Res* 2012; 111:131-150.
10. Braga RC, Tôrres ACB, Persiano CB, Alves RO, Fraga CAM, Barreiro EJ, Oliveira V. Determination of the cardioactive prototype LASSBio-294 and its metabolites in dog plasma by LC-MS/MS: application for a pharmacokinetic study. *J Pharm Biomed Anal* 2011; 55:1024-1030.
11. Carneiro EO, Andrade CH, Braga RC, Tôrres ACB, Alves RO, Lião LM, Fraga CAM, Barreiro EJ, Oliveira V. Structure-based prediction and biosynthesis of the major mammalian metabolite of the cardioactive prototype LASSBio-294. *Bioorg Med Chem Lett* 2010; 20:3734-3736.
12. Jaki T, Wolfsegger MJ. Estimation of pharmacokinetic parameters with the r package pk. *Pharm Stat* 2010, 10(3):1539 – 1612.

13. Zhang, Y.; Huo, M.; Zhou, J.; Xie, S. Pksolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in microsoft excel. *Comput Methods Programs in Biomed* 2010, 99:306-314.
14. Pariaut R. Cardiovascular physiology and diseases of the rabbit. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* 2009; 12:135-144.
15. Tilley LP. Essentials of canine and feline eletrocardiography. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger 1992, 470p.
16. Giannico AT, Garcia DAA, Lima L, Lara FA, Ponczek CAC, Shaw GC, Montiani-Ferreira F, Froes TR. Determination of normal echocardiographic, electrocardiographic, and radiographic cardiac parameters in conscious New Zeland White rabbit. *J Exot Pet Med* 2015; 24:223-234.
17. Bonagura JD, Fuentes VL. Ecocardiography In: Mattoon JS, Nyland TG. Small animal diagnostic ultrasound. 3 ed. Saint Louis: Elsevier; 2015, p.217-331.
18. Boon JA. Veterinary echocardiography. 2 ed. West Sussex: Wiley Blackwell; 2011, 632p.
19. Thomas WP, Garber CE, Jacobs GJ. Recommendations for standards in transthoracic two-dimensional echocardiography in the dog and cat. The echocardiography Committee of the Specialty of Cardiology, American College of Veterinary Internal Medicine. *J Vet Intern Med* 1993; 7(4):247-252.
20. Stypmann J, Engelen MA, Breithardt AK, et al: Doppler echocardiography and tissue Doppler imaging in the healthy rabbit: differences of cardiac function during awake and anaesthetised examination. *Int J Cardiol* 2007; 115: 164-170.
21. Casamian-Sorrosal D, Saunders R, Browne WJ, Elliott S, Fonfara S. M-mode, two-dimensional and Doppler echocardiographic findings in 40 healthy domestic pet rabbits. *J Vet Cardiol* 2014; 16:101-108.
22. Henik RA, Dolson MK, Wenzholz LJ. How to obtain a blood pressure measurement. *Clin Tech Small Anim Pract* 2005; 20(3):144-150.
23. Brown S, Atkins C, Bagley R, Carr A, Cowgill L, Davidson M, Egner B, Elliott J, Henik R, Labato M, Littman M, Polzin D, Ross L, Snyder P, Stepien R. Guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. *J Vet Intern Med* 2007; 21:542-558.
24. Buchanan J, Bücheler J. Vertebral scale system to measure canine heart size in radiographs. *J Am Vet Med Assoc* 1995; 206(2):194-199.
25. Thrall DE. Diagnóstico de radiologia veterinária. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.
26. Gava FN, Zacché E, Ortiz EMG, Champion T, Bandarra MB, Vasconcelos RO, Barbosa JC, Camacho AA. Doxorubicin induced dilated cardiomyopathy in a rabbit model: An update. *Res Vet Sci* 2013; 94:115-121.

27. Carneiro EO, Andrade CH, Braga RC, Tôrres ACB, Alves RO, Lião LM, Fraga CAM, Barreiro EJ, Oliveira V. Structure-based prediction and biosynthesis of the major mammalian metabolite of the cardioactive prototype LASSBio-294. *Bioorg Med Chem Lett* 2010; 20:3734-3736.
28. Fraga AGM, Silva LL; Fraga CAM, Barreiro EJ. CYP1A2-mediated biotransformation of cardioactive 2-thienylidene- 3,4-methylenedioxybenzoylhydrazine (LASSBio-294) by rat liver microsomes and human recombinant CYP enzymes. *Eur J Med Chem* 2011; 46:349-355.
29. Summerfield NJ, Boswood A, O'grady MR, Gordon SG, Dukes-McEwan J, Oyama MA, Smith S, Patteson M, French AT, Culshaw GJ, Braz-Ruivo L, Estrada A, O'sullivan ML, Loureiro J, Willis R, Watson P. Efficacy of Pimobendan in the Prevention of Congestive Heart Failure or Sudden Death in Doberman Pinschers with Preclinical Dilated Cardiomyopathy (The PROTECT Study). *J Vet Intern Med* 2012; 26:1337-1349.
30. Ware WA. Cardiovascular disease in small animal medicine. London: Manson Publishing Ltd; 2011. 396p
31. Pogwizd SM, Bers DM. Rabbit models of heart disease. *Drug Discov Today Dis Models* 2008; 5(3):185-193.
32. Bertinchant JP, Polge A, Juan JM, Oliva-Lauraire MC, Giuliani I, Marty-Double C, Burdy JY, Fabbro-Peray P, Laprade M, Bali JP, Granier C, Coussaye JE, Dauzat M. Evaluation of cardiac troponin I and T levels as markers of myocardial damage in doxorubicin-induced cardiomyopathy rats, and their relationship with echocardiographic and histological findings. *Clinica Chimica Acta* 2003, 329:39-51.
33. Van Meel JCA, Diederens W. Hemodynamic profile of the cardiotonic agent pimobendan. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989, 14(S2):S1-S6.
34. Asanoi H, Ishizaka S, Kameyama T, Ischise H, Sasayama S. Disparate inotropic and lusitropic responses to pimobendan in conscious dog with tachycardia-induced heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994, 23:268-274.
35. Haggstrom J, Lord PF, Hoglund K, Ljungvall I, Jons O, Kvart C, Hansson K. Short-term hemodynamic and neuroendocrine effects of pimobendan and benazepril in dogs with myxomatous mitral valve disease and congestive heart failure. *J Vet Intern Med* 2013, 27:1452-1462.
36. Wess G, Schulze A, Geraghty N, Hartmann K. Ability of a 5-minute electrocardiography (ECG) for predicting arrhythmias in Doberman Pinschers with cardiomyopathy in comparison with a 24-hour ambulatory ECG. *J Vet Intern Med* 2010, 24:367-371.
37. Hamabe L, Kawamura K, Kim S, Yoshiyuki R, Fukayama T, Shimizu M, Fukushima R, Tanaka R. Comparative evaluation of calcium-sensitizing agents, pimobendan and SCH00013, on the myocardial function of canine pacing-induced model of heart failure. *J Pharmacol Sci* 2014, 124:386-393.

38. Yata M, McLachlan AJ, Foster DJR, Page SW, Beijerink NJ. Pharmacokinetics and cardiovascular effects following a single oral administration of a nonaqueous pimobendan solution in healthy dogs. *J Vet Pharmacol Therap* 2016, 39:45-53
39. Dukes-McEwan J. Canine dilated cardiomyopathy. In: Fuentes VL, Johnson LR, Dennis S, editors. *BSAVA Manual of canine and feline cardiorespiratory medicine*. 2. ed. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association; 2010. p. 200-2012.
40. Ryoji I, Hitoshi I, Hideo I, Kohzo N, Makoto H, Mitsuhiro Y. Acute effects of a single low oral dose of pimobendan on left ventricular systolic and diastolic function in patients with congestive heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000, 35(6):897-905.
41. Tisser R, Chetboul V, Moraillon R, Nicolle A, Carlos C, Enriquez B, Pouchelon JL. Increased mitral valve regurgitation and myocardial hypertrophy in two dogs with long-term pimobendan therapy. *Cardiovasc Toxicol* 2005, 5(1):43-51.
42. Gordon SG, Saunders AB, Roland RM, Winter RL, Drourr L, Achen SE, Hariu CD, Fries RC, Boggess MM, Miller MW. Effect of oral administration of pimobendan in cats with heart failure. *JAVMA* 2012, 1:89.94.
43. Miyagawa Y, Machida N, Toda N, Tominaga Y, Takemura N. Comparison of the effects of long-term pimobendan and benazepril administration in normal cats. *J Vet Med Sci* 2016, 78(7):1099-106.
44. Rosa FA, Nogueira SSS, Gering AP, Heker MM, Gava FN, Zacche E, Camacho AA. Comparative study of arterial blood pressure obtained by different non-invasive methods in non-sedated New Zealand White rabbits. *J Vet Intern Med* 2013, 27:604-756.
45. Mizuno M, Yamano S, Chimura S, Hirakawa A, Ukai Y, Sawada T, Maetani S, Takahashi A, Mizuno T, Harada K, Shinoda A, Uchida S, Takeuchi J, Mizukoshi T, Endo M, Uechi M. *J Vet Med Sci* [on line]. A ser publicado 2016. [acesso 01 outubro de 2016]. Disponível em: <http://jstage.jst.go.jp> ISSN: 16-0069.
46. Klimtová I, Simunek T, Mazurová Y, Hrdina R, Gersl V, Adamcová M. Comparative study of chronic toxic effects of daunorubicin and doxorubicin in rabbits. *Hum Exp Toxicol* 2002, 21:649-657.
47. Talavera J, Giraldo A, Fernandez-Del-Palacio MJ, Garcia-Nicolas O, Seva J, Brooks G, Moraleda JM. An upgrade on the rabbit model of anthracycline-induced cardiomyopathy: shorter protocol, reduced mortality, and higher incidence of overt dilated cardiomyopathy. *Biomed Res Int* 2015; 2015:13p.
48. Washington IM, Van Hossier G. Clinical biochemistry and hematology. In: Suckow MA, Stevens KA, Wilson RP. *The laboratory rabbit, guinea pig, hamster, and other rodents*. London:Elsevier; 2012. p. 57-116.
49. Moore DM, Zimmerman K, Smith SA. Hematological assessment in pet rabbits: blood sample collection and blood cell identification. *Clin Lab Med* 2015, 35:617-627.

50. Melillo A. Rabbit Clinical Pathology. *J Exot Pet Med* 2007, 16(3):135-145.
51. Kanno N, Kuse H, Kawasaki M, Hara A, Kano R, Sasaki Y. Effects of pimobendan for mitral valve regurgitation in dogs. *J Vet Med Sci* 2007, 69(4):373-377.
52. Boyle KL, Leech E. A review of the pharmacology and clinical uses of pimobendan. *J Vet Emerg Crit Care* 2012; 22(4):398-408.
53. Jenkins JR. Rabbit Diagnostic Testing. *J Exot Pet Med* 2008, 17(1):4-15.

## CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Avaliando os resultados do presente estudo é possível concluir que o modelo utilizado para induzir a cardiomiopatia dilatada (CMD) serviu ao seu propósito, induzindo disfunção sistólica e diastólica em coelhos. Porém, é um modelo que ainda requer mais estudos, visto que os trabalhos relatam diferentes doses e tempos de indução, bem como distintas taxas de mortalidade. O pesquisador que escolher trabalhar com esse modelo de CMD, deve estar ciente de que seus animais podem apresentar respostas distintas em relação aos resultados publicados uma vez que, como foi demonstrado neste estudo, a resposta é individual.

Uma alternativa proposta, após observar os resultados, é testar um protocolo de indução com aumento gradual da dose de doxorubicina, uma vez que as mortes ocorreram no início do estudo e os animais apresentavam alterações compatíveis com toxicidade à medula óssea e sistema digestório, efeitos adversos comumente observados no início do protocolo quimioterápico de humanos, empregando essa antraciclina.

A escolha da espécie leporina como modelo para indução da CMD e para posterior estudo farmacológico foi acertada, visto vez que é uma espécie de fácil manipulação, manutenção e, baseando-se nos resultados, conclui-se que são bons modelos de estudo, permitindo o acesso a informações hemodinâmicas de forma não invasiva e coleta de grandes volumes sanguíneos para avaliação hematológica e bioquímica.

Além disso, a espécie não ofereceu empecilho à administração de fármacos via oral, mesmo em período prolongado, evitando a utilização de vias que poderiam aumentar o estresse dos animais, como as vias intraperitoneal e endovenosa, frequentemente utilizadas em estudos empregando coelhos e roedores.

Em relação ao protótipo à fármaco testado é possível inferir que esse apresenta futuro promissor para tratamento da insuficiência cardíaca (IC) visto que, assim como a pimobendana, incrementou a função sistólica e diastólica dos animais, sem que esses apresentassem alterações adversas comuns a outros agentes inotrópicos, como ação pró-arritmogênica. No entanto, mais estudos devem ser realizados, avaliando sua ação quando utilizado em associação aos protocolos padrões para IC, como os iECA e os diuréticos.

Os resultados do estudo seriam incrementados caso tivessem sido mensurados outros biomarcadores de lesão cardíaca, como a troponina-I, e biomarcadores de função miocárdica, como o NT-proBNP, como sugerido no projeto de tese original.

Porém, por falta de recursos, não foi possível apresentar esses dados, mas as amostras estão devidamente estocadas, aguardando liberação de verba, para que possam ser analisadas.

Do ponto de vista acadêmico, a execução do estudo permitiu o crescimento da doutoranda como pesquisadora, requerendo paciência e muito estudo, para entender que os caminhos para atingir os objetivos desejados nem sempre ocorrem de acordo com os relatados na literatura consultada e utilizada como modelo. Para executar um experimento, que durou aproximadamente oito meses, a pesquisadora também teve que evoluir sua capacidade de liderança, aprendendo a designar funções às pessoas envolvidas no estudo, respeitando as capacidades e características da personalidade de cada um.

## **ANEXOS**



## ANEXO 1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 17 de março de 2014.

**PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA DO  
PROTOCOLO N. 006/14**

**I - Finalidade do projeto de pesquisa:** avaliar os parâmetros cardiovasculares de coelhos com cardiomiopatia dilatada experimentalmente induzida por doxorrubicina e submetidos a ação do LASSBio 24 e comparar com o grupo controle positivo (pimobendan).

**II - Identificação:**

- ☐ **Título do projeto:** Ação do protótipo a fármaco LASSBio 294 sobre os parâmetros cardiovasculares em modelo experimental de cardiomiopatia dilatada em coelhos.
- ☐ **Pesquisador Responsável/ Unidade:** Ana Paula Araújo Costa / Escola de Veterinária e Zootecnia
- ☐ **Pesquisadores Participantes:** Rosângela de Oliveira Alves, Valéria de Oliveria, Veridiana Maria B. de Moura, Prescilla R. Nasciutti, Marcelo Borges dos Santos Júnior, Monique M. L. Teles, Evelyn M de S. Pinto, Brenda Torchia, Helton F. Oliveira.
- ☐ **Unidade onde será realizado:** Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG
- ☐ **Data de apresentação a CEUA:** 07/02/2014

**III - Objetivos e justificativa do projeto:** avaliar os parâmetros cardiovasculares de coelhos com cardiomiopatia dilatada (CMD) experimentalmente induzida pela doxorrubicina e submetidos a ação do LASSBio 294 e comparar esses com os do grupo controle positivo tratados com pimobendan.

**IV - Sumário do projeto:**

- ☐ **Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos e necessidade do número de animais:** segundo os autores, já foram realizados as avaliações alternativas com eficácia comprovada in vitro e um estudo pré-clínico com cachorros da raça Beagle.
- ☐ **Descrição do animal utilizado (número, espécie, linhagem, sexo, peso, etc):** São 20 coelhos machos, adultos, albinos, da raça Nova Zelândia, adquiridos em criadouro local.
- ☐ **Espécie e número total de animais utilizados:** coelhos, 20 animais.
- ☐ **Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade), alimentação/hidratação:** alojados no Biotério da EVZ-UFG em gaiolas individuais com livre acesso a ração e água e temperatura ambiente controlada em 24°C.
- ☐ **Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada e análise dos riscos aos pesquisadores/alunos:** Não se aplica

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia  
(Campus II) - CEP: 74001-970, Goiânia - Goiás, Fone: (55-62) 3521-1215.  
Email: ceua.ufg@gmail.com



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



☐ **Adequação da metodologia e considerações sobre o sofrimento imposto aos animais:** *Para aliviar o estresse dos animais a equipe será treinada para conter os animais de forma adequada. Será garantido ambiente limpo, com água e comida a vontade, clima controlado, evitando estresse térmico. Como fonte de enriquecimento adicional será oferecido cenoura e ou talos de couve pelo menos três vezes por semana, além da manutenção constante de pedaços de madeira eucalipto aromatizados com erva cidreira, como proposto por RICCI et al., 2013.*

☐ **Método de eutanásia:** *injeção intravenosa de tiopental sódico na dose de 65 mg/kg de peso corporal e, uma vez confirmada a morte dos animais, serão coletadas amostras da parede livre dos ventrículos para análise histológica.*

☐ **Destino do animal:** *Os corpos dos animais serão cremados após a coleta do fragmento do miocárdio.*

**IV – Comentários do relator frente às orientações da CEUA:**

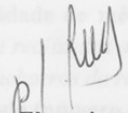
☐ **Quanto a documentos:** *Estão de acordo com a solicitação da CEUA.*

☐ **Quanto aos cuidados e manejo dos animais e riscos aos pesquisadores:** *são descritos uso de EPIs para minimizar os riscos.*

**V - Parecer da CEUA:**

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, consideramos o projeto **APROVADO**, conforme decisão desta Comissão.

**VI - Data da reunião: 17/03/2014**

  
**Dra. Ekaterina Akimovna Botovchenco Rivera**

Coordenadora da CEUA/PRPPG/UFV

**Profa. Dra. Sheila Araújo Teles**  
Coordenadora Geral de Pesquisa/UFV  
Mat. SIAPE 0300203