

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

RAQUEL DA SILVA FERREIRA

**EFEITOS DA OLEANDRINA, OUABAÍNA E DIGOXINA NO TRATAMENTO  
DA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA CAUSADA PELA DOXORRUBICINA**

Belo Horizonte  
2021

RAQUEL DA SILVA FERREIRA

**EFEITOS DA OLEANDRINA, OUABAÍNA E DIGOXINA NO TRATAMENTO  
DA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA CAUSADA PELA DOXORRUBICINA**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Orientadora: Marília Martins Melo.

Coorientadora: Ana Flávia Machado Botelho.

Belo Horizonte  
2021

F383e Ferreira, Raquel da Silva, -1993  
Efeitos da oleandrina, ouabaina e digoxina no tratamento da insuficiência cardíaca causada pela doxorubicina/ Raquel da Silva Ferreira, - 2021.

91 f.:il

Orientadora: Marília Martins Melo

Coorientadora: Ana Flávia Machado Botelho.

Dissertação (Mestrado) apresentado à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Bibliografia: f.:75 a 90.

1. Animais domésticos – Doenças - Teses – 2. Sistema cardiovascular -Teses – I. Melo, Marília Martins – II. Botelho, Ana Flávia Machado – III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – IV. Título.

CDD – 636.089 7

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569

Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

**RAQUEL DA SILVA FERREIRA**

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Medicina e Cirurgia Veterinária.

Aprovado(a) em 31 de março de 2021, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Marília Martins Melo –  
Presidente/Orientador(a)

Dr.(a). Roberto Baracat de Araújo

Dr.(a). Matheus Matioli Mantovani



Documento assinado eletronicamente por **Marília Martins Melo, Professora do Magistério Superior**, em 31/03/2021, às 11:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro](#)

[de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Roberto Baracat de Araujo, Chefe de departamento**, em [31/03/2021, às 14:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Matheus Matioli Mantovani, Professor do Magistério Superior**, em 01/04/2021, às 13:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543,](#)

[de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0626451** eo código CRC **C3B511FE**.

---

---

**Referência:** Processo nº 23072.213929/2021-91

SEI nº 0626451

“Analisa o fluxo da vida nas águas, nas plantas, nas flores, nos animais, nas pessoas e em ti mesmo e verás as oportunidades de crescimento que todo ser está destinado a alcançar.”

Hammed,1998

## AGRADECIMENTOS

Sou grata a Deus pela vida e por todas as boas oportunidades colocadas em meu caminho. Que eu sempre tenha a clareza para enxergá-las.

Agradeço à professora Marília, por todo o carinho, cuidado e acolhimento. Por ter acreditado que eu seria capaz de realizar esse projeto e por ter me ensinado que a maternidade não precisa ser um limitador das nossas realizações, mas sim um motor propulsor delas. Obrigada pela atenção e por todos os conselhos. Guardarei muitas de suas palavras sempre comigo.

Agradeço aos meus pais, Carlos e Katia, por todo o amor que me dão, pelo apoio incondicional que recebo a cada escolha, pelos incentivos. Essa conquista também é de vocês, fruto de uma vida de dedicação aos filhos e à família. Minha gratidão será eterna.

Agradeço à minha irmã Juliana, uma grande amiga, fonte de apoio constante, presente nos momentos mais difíceis, fazendo por mim o que mais ninguém faria. Muito obrigada.

Sou grata ao Antônio, meu companheiro de jornada, que embarca comigo em tudo que resolvo fazer, sempre me tranquilizando e dizendo que vai ficar tudo bem. Obrigada pela parceria de vida, por todo o carinho e amor.

Agradeço ao Vicente, que hoje é a principal razão pela qual faço tudo que faço e me impulsiona a ser uma pessoa melhor.

Agradeço à professora Ana Flávia por toda sua atenção, auxílio, paciência e presteza. Sua ajuda foi de grande valia.

Agradeço ao professor Matheus por toda sua ajuda com a avaliação dos dados e sua disponibilidade em ensinar.

Sou grata às alunas de iniciação científica Fran, Jéssica e Paula. Sem vocês, nada disso seria possível.

Agradeço à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais por ser uma referência na pesquisa veterinária brasileira, casa onde pude aprender conhecimentos teóricos e usar de suas instalações para aprimorar a prática da medicina veterinária e a realização do experimento.

Agradeço ao Laboratório de Fisiologia Cardíaca do Instituto de Ciências Biológicas pela disponibilidade e por nos auxiliarem na realização de exames complementares nos animais.

Por fim, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos e aos órgãos de fomento Conselho Nacional de

Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) por financiarem esta pesquisa.

## RESUMO

A insuficiência cardíaca congestiva atinge milhões de pessoas em todo o mundo e também é uma realidade na medicina veterinária de pequenos animais. Novas modalidades terapêuticas são importantes para melhorar a qualidade de vida dos portadores dessa síndrome. Para avaliar o potencial terapêutico dos glicosídeos cardioativos oleandrina e ouabaína e compará-los à digoxina, glicosídeo cardioativo com uso bem estabelecido, foram usados 20 ratos Wistar, distribuídos em quatro grupos, com cinco animais em cada grupo. Os animais foram desafiados com uma única aplicação intraperitoneal de doxorubicina, na dose de 12mg/kg, e tratados com solução salina e com os glicosídeos oleandrina, ouabaína e digoxina, na dose de 50µg/kg, durante sete dias. Foram submetidos a exames de ecocardiografia, eletrocardiografia, hematológicos e bioquímicos séricos. Todos os animais apresentaram insuficiência cardíaca congestiva, constatada por redução da fração de ejeção. Oleandrina e digoxina foram capazes de reduzir significativamente ( $p<0,05$ ) o remodelamento excêntrico causado pela doxorubicina, porém foram significativamente inferiores ( $p<0,05$ ) ao grupo controle na manutenção do volume sistólico e do volume do ventrículo esquerdo na diástole. Demais parâmetros cardíacos avaliados não apresentaram diferenças significativas. Todos os animais apresentaram aumento do número de eritrócitos, aumento da duração do complexo QRS no ECG e, necrose miocárdica na análise histopatológica. Conclui-se que os glicosídeos oleandrina, ouabaína e digoxina, na posologia empregada, não apresentaram potencial terapêutico para tratamento de insuficiência cardíaca congestiva causada pela doxorubicina.

**Palavras-chave:** Cardenólídeos, glicosídeos cardioativos, digitálicos, inotropismo, remodelamento cardíaco.

## ABSTRACT

Congestive heart failure affects millions of people worldwide and is also a reality in small animal veterinary medicine. New therapeutic modalities are important to improve the quality of life of patients with this syndrome. In order to evaluate the therapeutic potential of cardioactive glycosides oleandrin and ouabain, and compare them to digoxin, glycoside with well-established use, 20 Wistar rats were used in the study, distributed into four groups with five animals in each group. The animals were challenged with a single intraperitoneal application of doxorubicin, at a dose of 12mg / kg, and treated with saline solution and the glycosides oleandrin, ouabain and digoxin, at a dose of 50µg/kg for seven days. They underwent echocardiography, electrocardiography, hematological and biochemical tests. All animals presented congestive heart failure, which was verified by a reduction in the ejection fraction. Oleandrin and digoxin were able to significantly reduce ( $p < 0.05$ ) the eccentric remodeling caused by doxorubicin. Oleandrin and digoxin were significantly lower ( $p < 0.05$ ) than control group in maintaining systolic volume and left ventricular volume in diastole. Other cardiac parameters evaluated did not show significant statistical differences. All animals showed an increase in erythrocyte count, an increase in the duration of the QRS complex on the ECG and myocardial necrosis in the histopathological analysis. It is concluded that the glycosides oleandrin, ouabain and digoxin in the used dosage, do not present therapeutic potential for the treatment of congestive heart failure caused by doxorubicin.

**Keywords:** Cardenolides, cardioactive glycosides, digitalis, inotropism, cardiac remodeling

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1. Grupos patofisiológicos da ICC .....	24
Quadro 2. Classificação e tratamento da ICC.....	29

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Intervalo de referência dos parâmetros ecocardiográficos de ratos Wistar hígdos .	46
Tabela 2. Parâmetros eletrocardiográficos de ratos Wistar hígdos no tempo zero.....	56
Tabela 3. Parâmetros eletrocardiográficos de ratos Wistar desafiados com doxorubicina e tratados com salina, oleandrina, ouabaína e digoxina.....	57

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Lei de Frank-Starling. ....	25
Figura 2. Correlação entre o potencial de ação da célula ventricular e o eletrocardiograma). ....	27
Figura 3. Comportamento do potencial de ação nas diferentes células cardíacas. A. Potencial de ação na célula ventricular. B. Potencial de ação na célula nodal. C. Potencial de ação na célula atrial. ....	28
Figura 4. Ação da doxorubicina nas células cancerígenas e nos cardiomiócitos. ....	30
Figura 5. Estrutura química dos cardenólídeos. ....	35
Figura 6. Mecanismo de ação dos glicosídeos cardioativos. ....	36
Figura 7. Rato Wistar adaptado ao ambiente após a chegada ao laboratório. ....	37
Figura 8. Rato Wistar recebendo aplicação intraperitoneal de doxorubicina. ....	39
Figura 9. A. Aparelho de anestesia inalatória utilizado no experimento. B. Rato Wistar recebendo anestesia inalatória. ....	39
Figura 10. Rato Wistar anestesiado, em decúbito lateral direito e com eletrodos posicionados para realização do eletrocardiograma. ....	40
Figura 11. Apresentação dos sinais clínicos em ratos Wistar utilizados no experimento. ....	45
Figura 12. Média e desvio-padrão dos parâmetros ecocardiográficos de ratos desafiados com doxorubicina e tratados com salina, oleandrina, ouabaína e digoxina. ....	49
Figura 13. Média e desvio-padrão dos parâmetros ecocardiográficos de ratos desafiados com doxorubicina e tratados com salina, oleandrina, ouabaína e digoxina ....	50
Figura 14. Imagem ecocardiográfica de um rato desafiado com doxorubicina e tratado com oleandrina. A imagem acima da figura dp modo B, mostra corte longitudinal do ventrículo esquerdo. A imagem abaixo, é do modo M, do corte longitudinal do ventrículo esquerdo. ....	53
Figura 15. Eletrocardiograma de um rato antes do desafio com doxorubicina e tratamento com os glicosídeos cardioativos. ECG mostrando ritmo sinusal, na derivação D2, a 25mm/s, sensibilidade N. ....	56
Figura 16. Eletrocardiograma de um rato Wistar após desafio com doxorubicina e tratamento com ouabaína. Observa-se ritmo sinusal, alargamento do complexo qrs, na derivação d2, velocidade de 25mm/s, sensibilidade n. ....	57
Figura 17. Eletrocardiograma de um rato Wistar do grupo controle após desafio com doxorubicina. Observa-se ritmo sinusal, com aumento da amplitude da onda t e prolongamento do intervalo qt, na derivação d2, a 25mm/s, sensibilidade n. ....	57

Figura 18. Média e desvio-padrão dos parâmetros hematológicos de ratos Wistar desafiados com doxorubicina e tratados com salina, oleandrina, ouabaína e digoxina. ....	59
Figura 19. Média e desvio-padrão dos parâmetros hematológicos de ratos desafiados com doxorubicina e tratados com salina, oleandrina, ouabaína e digoxina. ....	60
Figura 20. Média e desvio-padrão dos parâmetros hematológicos e plaquetários de ratos desafiados com doxorubicina e tratados com salina, oleandrina, ouabaína e digoxina. ....	64
Figura 21. Média e desvio-padrão do leucograma de ratos desafiados com doxorubicina e tratados com salina, oleandrina, ouabaína e digoxina. ....	65
Figura 22. Média e desvio-padrão dos parâmetros bioquímicos de ratos desafiados com doxorubicina e tratados com salina, oleandrina, ouabaína e digoxina. ....	68
Figura 23. Alterações macroscópicas causadas em rato Wistar após desafio com doxorubicina e tratamento com digoxina. ....	71
Figura 24. Cortes histológicos do coração de ratos Wistar desafiados com doxorubicina e tratados com salina e oleandrina. ....	72
Figura 25. Cortes histológicos do coração de ratos Wistar desafiados com doxorubicina e tratados com ouabaína e digoxina. ....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - Porcentagem

°C - Graus Celsius

µg - Micrograma

µL - Microlitro

µm - Micrometro

bpm - Batimentos por minuto.

Abs - Absolutos

AD - Átrio direito

AE - Átrio esquerdo

Ang I - Angiotensina I

Ang II - Angiotensina II

ANOVA - Análise de variância

AST - Aspartato aminotransferase

ATPase - Adenosinatrifosfatase

AV - Átrio-ventricular

CEUA - Comitê de Ética do Uso de Animais

CHCM - Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

CMD - Cardiomiopatia dilatada

CMH - Cardiomiopatia hipertrófica

COM - Controle

COX-2 - Ciclo-oxigenase 2

cTn - Troponina cardíaca

cTnI - Troponina cardíaca do tipo I

DC - Débito cardíaco

DIAMd - Diâmetro do ventrículo esquerdo na diástole

DIAMs - Diâmetro do ventrículo esquerdo na sístole

DIG - Digoxina

dL - Decilitro

DMVM - Degeneração mixomatosa da valva mitral

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DOX - Doxorrubicina

DRC - Doença renal crônica

DRZ - Dexarone

ECAi - Inibidor da enzima conversora de angiotensina

ECG - Eletrocardiograma

ECO - Ecocardiografia

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EF - Fração de ejeção

EOS - Eosinófilos

ERI - Eritrócitos

EV - Escola de Veterinária

FC - Frequência cardíaca

fL - Fentolítro

FS - Fração de encurtamento

g - Grama

G1 - Grupo 1

G2 - Grupo 2

G3 - Grupo 3

G4 - Grupo 4

GC - Glicosídeo cardioativo

Hb - Hemoglobina

HCM - Hemoglobina Corpuscular Média

Ht - Hematócrito

IC - Insuficiência cardíaca  
ICB - Instituto de Ciências Biológicas  
ICC - Insuficiência cardíaca congestiva  
IL - Interleucina  
IP - Intraperitoneal  
kg - Quilograma  
L - Litro  
LDH - Lactato desidrogenase  
LEC - Líquido extracelular  
LEU - Leucócitos  
LIC - Líquido intracelular  
LINF - Linfócitos  
mg - Miligrama  
MHz - Mega hertz  
min - Minuto  
mL - Mililitro  
mm - Milímetro  
ms - Milissegundo  
mV - Milivolt  
n - Número de animais por grupo  
Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> - ATPase - Bomba de sódio e potássio dependente de energia  
NAV - Nó átrio-ventricular  
NEU - Neutrófilos  
ng - Nanograma  
NSA - Nó sinoatrial  
NYHA - New York Heart Association  
OLE - Oleandrina

OUA - Ouabaína

PAF - Fator ativador de plaquetas

PDW - Amplitude de distribuição volumétrica das plaquetas

pg - Picograma

P-LCR - Percentual de plaquetas grandes

PLT - Plaquetas

PNA - Peptídeo natriurético atrial

PNC - Peptídeo natriurético cerebral

RDW-CV - Coeficiente de variação da amplitude de eritrócitos

RDW-SD - Desvio da amplitude de eritrócitos

s - Segundo

SC - Subcutâneo

SDMA - Dimetilarginina simétrica

SRAA - Sistema renina-angiotensina-aldosterona

T0 - Tempo zero

T1 - Tempo um

TFG - Taxa de filtração glomerular

Top-2 $\alpha$  - Topoisomerase 2 $\alpha$

Top-2 $\beta$  - Topoisomerase 2 $\beta$

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

UI - Unidade Internacional

VCM - Volume Corpuscular Médio

VD - Ventrículo direito

VE - Ventrículo esquerdo

VOLd - Volume do ventrículo esquerdo na diástole

VOLs - Volume do ventrículo esquerdo na sístole

VPM - Volume plaquetário médio

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>20</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
2.1. Objetivo geral.....	21
2.2. Objetivos específicos.....	21
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>22</b>
3.1. Definição de insuficiência cardíaca congestiva .....	22
3.2. Etiologia da insuficiência cardíaca.....	22
3.3. Fisiopatologia da insuficiência cardíaca.....	23
3.4. Doxorrubicina como causa de insuficiência cardíaca .....	29
3.5. Sinais clínicos .....	31
3.6. Diagnóstico .....	31
3.7. Tratamento .....	32
3.8. Glicosídeos cardioativos no tratamento da insuficiência cardíaca.....	34
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
4.1. Animais e medicamentos.....	37
4.2. Delineamento experimental .....	38
4.3. Ecocardiografia .....	39
4.4. Eletrocardiografia.....	40
4.5. Exame hematológico .....	41
4.6. Exames bioquímicos.....	41
4.7. Avaliação histopatológica.....	41
4.8. Análise estatística .....	41
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>

5.1. Seleção dos animais e das doses de medicamentos .....	43
5.2. Quadro clínico dos animais.....	43
5.3. Ecocardiografia .....	45
5.4. Eletrocardiografia.....	53
5.5. Hematologia.....	58
5.6. Bioquímica sérica.....	66
5.7. Avaliação histológica do coração.....	70
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>74</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>75</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca congestiva (ICC) é uma síndrome que envolve alterações funcionais e/ou estruturais que impedem que o coração ejete ou acomode sangue nos valores pressóricos normais (Mangini et al., 2013). É relevante na atualidade, uma vez que as doenças cardiovasculares são a principal causa de óbitos em humanos. Em cães e gatos, também apresentam alta prevalência (Rush et al., 2002; Riesen et al., 2007).

O tratamento da ICC tem o objetivo de diminuir a manifestação dos sintomas e aumentar a qualidade de vida dos doentes. Tendo isso em vista, é importante investir em novas modalidades terapêuticas (Borlaug e Paulus, 2010).

Os glicosídeos cardioativos (GCs) foram historicamente descritos em plantas após associação entre os sinais clínicos cardiovasculares e sua capacidade de inibir a bomba de sódio e potássio dependente de energia ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATPase) do coração. A digoxina foi isolada em plantas do gênero *Digitalis*, como a *D. lanata* e *D. purpurea* (Braga et al., 1997); oleandrina a partir da *Nerium oleander* (Pedroza et al., 2015) e, a ouabaína em plantas do gênero *Acokanthera* e *Strophanthus* (Cassels, 1985; Strobach et al., 1986), além de ter sido também descrita no metabolismo dos mamíferos (Hamlyn et al., 1991).

A digoxina, além de inibir a bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATPase, possui efeito inotrópico positivo. Foi uma droga muito utilizada no tratamento da ICC. É indicada para casos graves ou pacientes com fibrilação atrial (Anter et al., 2009).

Os outros GCs, oleandrina e ouabaína, assim como a digoxina, também possuem efeito inotrópico positivo e poderiam ser úteis na terapêutica da ICC. Todavia, as pequenas diferenças entre suas estruturas, especialmente do anel lactona e resíduos de açúcares podem determinar alterações na farmacocinética e farmacodinâmica desses compostos, e causar diferentes efeitos na fisiologia cardiovascular.

Diante desse contexto, são necessários estudos para a avaliação do comportamento farmacológico desses GCs na ICC, indicando a possibilidade do seu uso como parte do tratamento.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos terapêuticos dos glicosídeos: oleandrina, ouabaína e digoxina na insuficiência cardíaca induzida pela doxorubicina, usando o rato como modelo experimental.

### 2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a atividade elétrica e a morfologia cardíaca de ratos com insuficiência cardíaca e tratados com glicosídeos cardioativos oleandrina, ouabaína e digoxina por meio do eletrocardiograma (ECG) e da ecocardiografia (ECO)
- Estudar o perfil sanguíneo hematológico de ratos com insuficiência cardíaca e tratados com glicosídeos cardioativos oleandrina, ouabaína e digoxina.
- Estudar o perfil bioquímico sérico, que compreenderá aspartato aminotransferase (AST), lactato desidrogenase (LDH), troponina cardíaca I (cTnI), ureia, creatinina e dimetilarginina simétrica (SDMA), de ratos com ICC e tratados com os glicosídeos cardioativos oleandrina, ouabaína e digoxina.
- Avaliar lesões cardíacas através dos exames macroscópicos e microscópicos do coração de ratos com IC tratados com glicosídeos cardioativos oleandrina, ouabaína e digoxina.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Definição de insuficiência cardíaca congestiva

A ICC é uma síndrome clínica complexa que envolve disfunção cardíaca, ativação neuro-hormonal, retenção de sódio e água e aumento das pressões de enchimento do ventrículo esquerdo (VE) (Schober et al., 2010).

O ventrículo tem a função de enchimento ou esvaziamento prejudicada, o que pode ser resultado de anormalidades estruturais ou funcionais (Figueroa e Peters, 2006). Dessa forma, o coração não consegue atender à demanda energética do organismo quando há uma maior exigência física, progredindo para inabilidade em suprir as necessidades metabólicas no repouso (Chiariello e Perrone-Filardi, 1999).

A disfunção é diastólica quando ocorre dificuldade no enchimento ou relaxamento do VE. Já a disfunção sistólica ocorre quando há dificuldade no esvaziamento do VE, representada por uma fração de ejeção reduzida (Gomberg-Maitland et al., 2001).

A ICC se apresenta de forma aguda ou crônica. É considerada aguda quando há rápido surgimento de sinais clínicos, o que requer hospitalização imediata. Nesses casos, o paciente apresenta sintomas de congestão sistêmica e pulmonar. O quadro congestivo pode ocorrer antes do aparecimento de sinais, o que leva à isquemia do subendocárdio; alteração morfológica do VE, causando insuficiência mitral secundária; deficiência na drenagem das veias coronárias, culminando em disfunção diastólica. Por esses motivos, a insuficiência cardíaca (IC) aguda pode levar à IC crônica (Gheorghide et al., 2006).

Considera-se a IC crônica quando há deterioração da performance cardíaca, caracterizada por alterações mecânicas e neuro-hormonais complexas, redução do débito cardíaco, desarranjos metabólicos e morte de células miocárdicas (Hoffman, 2016). Além disso, é uma doença progressiva, que dura anos e compromete a qualidade de vida do portador (Sinescu e Axente, 2010).

Cerca de 10 a 15% dos cães são acometidos por doenças cardíacas, que podem ser congênicas ou adquiridas e levar ao desenvolvimento de ICC (Rush, 2002). Em estudos retrospectivos realizados em gatos com doença cardíaca de ocorrência natural, 50% a 66% apresentaram ICC (Rush, 2002; Ferasin et al., 2003).

#### 3.2. Etiologia da insuficiência cardíaca

A IC pode ter inúmeras causas. Pode ser resultado de doenças que acometem o miocárdio, tais como cicatrizes miocárdicas, microcirculação coronariana anormal, disfunção

endotelial, danos tóxicos por drogas, metais pesados, medicações ou radiação. Desarranjos metabólicos, desordens nutricionais e anormalidades genéticas também interferem no funcionamento adequado do músculo cardíaco. Condições anormais de enchimento como hipertensão, defeitos valvares ou de parede, doenças do pericárdio, estados de alto débito cardíaco (anemia grave, sepse) e sobrecarga de volume (doença renal, iatrogênica por excesso de fluidoterapia) também podem levar à IC. Por fim, bradiarritmias e taquiarritmias são possíveis desencadeantes de falha cardíaca (Ponikowski et al., 2016).

Em cães, a degeneração mixomatosa da valva mitral (DMVM) é a afecção cardiovascular mais comum que leva à IC. É observada principalmente em cães de pequeno porte (Borgarelli e Buchanan, 2012). A cardiomiopatia dilatada (CMD) também é uma etiologia importante e é mais comum em raças de grande porte (Oyama et al., 2008). Já a cardiopatia mais observada em gatos é a cardiomiopatia hipertrófica (CMH) e é a causa mais importante de IC nessa espécie (Ferasin et al., 2003).

### 3.3. Fisiopatologia da insuficiência cardíaca

A performance cardíaca é a habilidade do coração em bombear sangue para as artérias, garantindo fluxo sanguíneo adequado para os tecidos. É expressa pelo débito cardíaco (DC) ou pelo volume sistólico (VS) e modulada por vários fatores: frequência cardíaca (FC), condições de carga, moléculas contráteis, geometria ventricular, rigidez muscular, acomodação ventricular e vascular e atividade neuro-humoral (Muir e Hamlin, 2020).

O DC é a quantidade de sangue, em litros, ejetado pelo coração por minuto. É produto do VS e da FC (Vincent, 2008). O VS é o volume de sangue ejetado pelo VE a cada batimento cardíaco e é dependente da pré-carga, da pós-carga e da contratilidade. A pré-carga diz respeito ao grau de estiramento das fibras miocárdicas ao final da diástole; a pós-carga é representada pela resistência vascular que se opõe à ejeção do sangue pelo ventrículo; a contratilidade é o estado inotrópico do coração (Kemp e Cont, 2012).

O DC possui quatro determinantes: FC, contratilidade, pré-carga e pós-carga (Kemp e Cont, 2012). A FC deve operar em sua faixa fisiológica. Aumento da FC resulta em maior DC. Contudo, frequências muito elevadas podem comprometer o DC, pois há prejuízo ao enchimento do coração. Redução da FC leva à redução do DC (Vincent, 2008).

A pré-carga está intimamente relacionada à Lei de Frank-Starling. Quanto maior o volume de sangue no ventrículo após o seu enchimento (volume diastólico final), maior o estiramento das fibras cardíacas e maior a força de contração, pois há recrutamento imediato do aparato contrátil. O volume diastólico final pode sofrer aumento por elevado retorno venoso

(Schotola et al., 2017). Já a pós-carga é a força de cada cardiomiócito durante a sístole, com o objetivo de vencer a resistência aórtica (Schotola et al., 2017).

A contratilidade cardíaca é uma propriedade única e intrínseca do músculo cardíaco e pode ser definida como a tensão e a velocidade de encurtamento das fibras miocárdicas. É independente de carga (Wijayasiri et al., 2012).

Na presença de doença cardíaca ou extra cardíaca que gere diminuição da perfusão, inúmeros mecanismos compensatórios são acionados para manutenção do débito cardíaco e prevenção da ICC. Isso ocorre antes do estabelecimento dos sintomas. De acordo com Nelson (2003), há cinco principais grupos patofisiológicos de ICC: falência do miocárdio, sobrecarga de volume, sobrecarga de pressão, disfunção diastólica e arritmias (Quadro 1).

QUADRO 1. Grupos patofisiológicos da ICC

<b>Classificação</b>	<b>Fisiopatologia</b>	<b>Exemplo</b>
Falência do miocárdio	Fraqueza do músculo cardíaco. Contratilidade reduzida, disfunção sistólica. Insuficiência valvar pode estar presente	Cardiomiopatia dilatada, doenças que causam sobrecarga crônica de volume
Sobrecarga de volume	Doenças que sobrecarregam o enchimento ventricular, causando hipertrofia excêntrica. Contratilidade reduz com o tempo devido ao estresse na parede do coração	Insuficiências valvulares, shunt átrio-ventricular (AV) (persistência de ducto arterioso, defeito septal ventricular), anemia crônica
Sobrecarga de pressão	Doenças que dificultam ou obstruem a ejeção ventricular, causando hipertrofia concêntrica. Disfunção diastólica ocorre, assim como isquemia ventricular	Estenose subaórtica, estenose pulmonar, hipertensão sistêmica, hipertensão pulmonar
Disfunção diastólica	Doenças que prejudicam o enchimento ventricular. Complacência ventricular reduzida é a anormalidade primária, e não a sobrecarga de pressão	Cardiomiopatia hipertrófica, cardiomiopatia restritiva, efusão pericárdica, pericardite constritiva
Arritmias	Taquiarritmias ou bradiarritmias persistentes causam isquemia do miocárdio e retenção de fluido	Taquicardias supraventriculares, taquicardia ventricular, bradiarritmias

Fonte: Adaptado de Nelson, (2003).

A Lei de Frank-Starling tem papel fundamental nos estágios iniciais da ICC. Com a redução da capacidade contrátil do miocárdio, há uma redução do VS. Como a quantidade de sangue ejetada pelo ventrículo é menor do que deveria, há um maior acúmulo de sangue na câmara cardíaca, o que promove estiramento das fibras miocárdicas e gera um maior VS no batimento cardíaco subsequente, melhorando o DC (Ait Mou et al., 2015). Contudo, a ação desse mecanismo é limitada, pois com a progressão da doença, há piora da capacidade contrátil, maior acúmulo de sangue e congestão, como mostrado na figura abaixo. A ativação neuro-hormonal atua conjuntamente com esse mecanismo (Delicce e Makaryus, 2020).

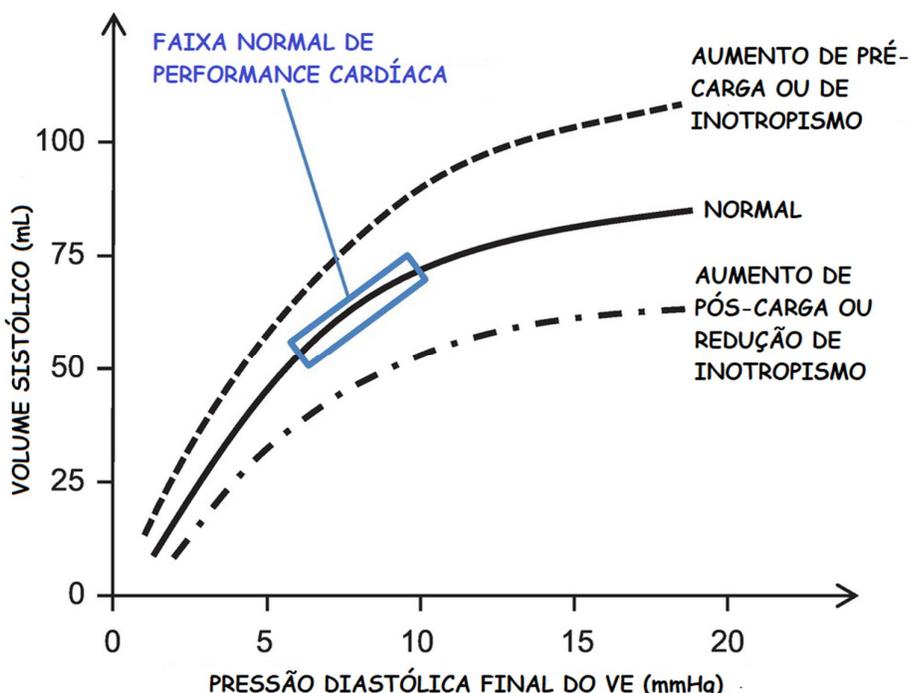


Figura 1. Lei de Frank-Starling. (Fonte: Adaptado de Chambers, Huang e Mathews, 2019).

Alterações na hemodinâmica, representadas por mudanças na pré-carga, pós-carga ou em ambas, promovem um remodelamento estrutural do coração, representado principalmente por hipertrofia do VE. A pré-carga pode estar aumentada por regurgitação aórtica ou mitral e doença renal, por exemplo. Algumas situações em que a pós-carga pode estar elevada são a hipertensão arterial, estenose aórtica e ativação neuroendócrina. O remodelamento deletério é caracterizado por disfunção sistólica ou diastólica, diminuição da vascularização do miocárdio, morte celular e fibrose de cardiomiócitos, alterações moleculares da contração cardíaca e estresse oxidativo (Maack, 2016).

Outra resposta orgânica ao baixo DC é a ativação do sistema nervoso autônomo simpático, aumentando a liberação das catecolaminas noradrenalina e epinefrina. Isso resulta em maior FC, maior inotropismo e vasoconstrição arteriolar. O elevado tônus simpático ativa o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (Sisson, 2004).

O SRAA é ativado quando há redução da perfusão e do volume circulante (Bock et al., 1992). A renina é produzida, levando à conversão de angiotensinogênio em angiotensina I (Ang I). Ang I é convertida em angiotensina II (Ang II), principal responsável pela resposta sistêmica à depleção de pressão e volume. Ang II promove vasoconstrição, reabsorção de sódio e água e liberação de aldosterona (Sayer e Bath, 2014).

A ativação crônica do SRAA é deletéria para o organismo, gerando efeitos adversos como fibrose e hipertrofia do miocárdio e da vasculatura, aumento da produção de radicais livres, efeito pró-inflamatório e pró-arritmico, hipertensão arterial sistêmica, disfunção de endotélio vascular, disfunção de barorreceptores, aumento do apetite por sal, aumento da sede, acúmulo de sal e água, congestão, perda de potássio, lesão renal, entre outros (Ames et al., 2019).

Uma resposta do organismo à sua própria compensação é a produção do peptídeo natriurético atrial (PNA) e do peptídeo natriurético cerebral (PNC). O PNA é produzido nos átrios quando há sobrecarga de volume e estiramento das fibras do miocárdio. O PNC é produzido nos ventrículos. Ambos promovem natriurese e diurese, na tentativa de suplantar as implicações do SRAA (Connolly et al., 2008).

Além das alterações fisiológicas citadas, o coração com insuficiência cardíaca pode ter suas propriedades elétricas modificadas e levar ao desenvolvimento de arritmias (De Ferrari e Tavazzi, 1998).

Em condições normais, os cardiomiócitos dependem do potencial de ação para que ocorra a contração muscular. A concentração e o movimento de íons entre o líquido intracelular (LIC) e o líquido extracelular (LEC) é determinante para a atividade das células. Em condições normais, a concentração de  $\text{Na}^+$  é maior no LEC, e a concentração de  $\text{K}^+$  é maior no LIC, contribuindo para a manutenção de cargas elétricas. O potencial transmembrana é negativo e varia de  $-80\text{mV}$  a  $-90\text{mV}$ . A  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase possui papel fundamental na manutenção da homeostase celular, atuando contra o gradiente de concentração, com gasto energético, ao movimentar três íons de  $\text{Na}^+$  para o LEC e dois íons de  $\text{K}^+$  para o LIC (Santili, 2017).

Existem diferenças entre o potencial de ação das células marcapasso e dos miócitos atriais e ventriculares. Nos miócitos, o potencial se divide em 4 fases e depende do fluxo de íons pela membrana plasmática. É caracterizado pela fase 0, na qual ocorre, após estímulo,

abertura dos canais de  $\text{Na}^+$  dependentes de voltagem e influxo de  $\text{Na}^+$ , deixando a célula com carga positiva, fenômeno chamado de despolarização. Em seguida, acontece a fase 1, na qual há abertura de canais de  $\text{K}^+$  e um efluxo desse íon, tornando a carga celular ligeiramente mais negativa. Depois, vem a fase 2, denominada de platô, caracterizada pelo influxo de íons  $\text{Ca}^{++}$ , que se dá por canais lentos e canais rápidos. A fase 3 ou repolarização ocorre devido à abertura de canais de  $\text{K}^+$  e efluxo dele, tornando a célula negativa novamente. Na fase 4, a carga celular já voltou ao normal e é conhecida como fase de repouso (Nerbonne e Kass, 2005).

Nas células do nó sinoatrial (NSA) e do nó átrio-ventricular (NAV), há diferente expressão de canais iônicos, resultando em potencial de ação menos negativo, ausência de fase 1 e despolarização contínua (Koeppen e Stanton, 2009).

A figura abaixo mostra o comportamento do potencial de ação nas células cardíacas.

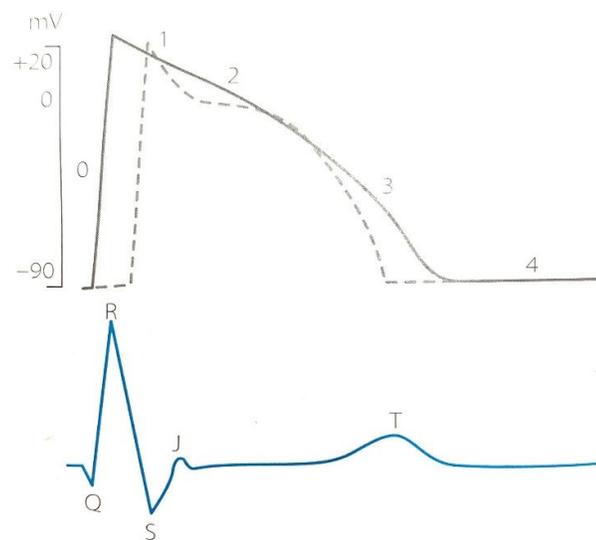


Figura 2. Correlação entre o potencial de ação da célula ventricular e o eletrocardiograma (Fonte: Santili, 2017).

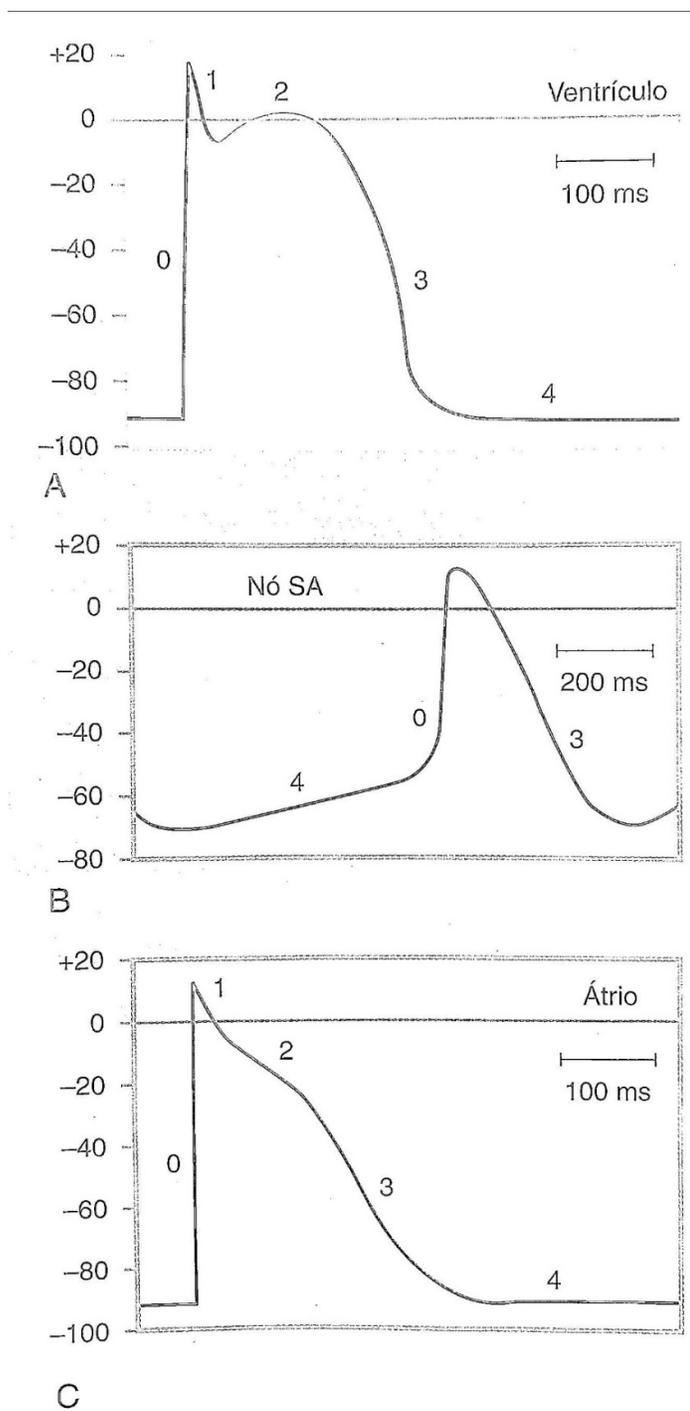


Figura 3. Comportamento do potencial de ação nas diferentes células cardíacas. A. Potencial de ação na célula ventricular. B. Potencial de ação na célula nodal. C. Potencial de ação na célula atrial. (Fonte: Stanton e Koeppen, 2009).

Ainda de acordo com De Ferrari e Tavazzi (1998), as células de um coração insuficiente apresentam duração maior do potencial de ação, alterações nos canais iônicos, redução da

atividade das correntes de potássio, o que leva a uma automaticidade e condução anormais. As alterações eletrofisiológicas aceleram a progressão da insuficiência sistólica e diastólica.

#### 3.4. Doxorrubicina como causa de insuficiência cardíaca

A interface cardiologia-oncologia é recente na medicina. O sucesso no tratamento de neoplasias e o aumento da sobrevivência de pacientes acometidos permitiu o estabelecimento de relação causa-efeito: uso de drogas antineoplásicas como causadoras de ICC (Zamorano et al, 2016).

A doxorrubicina (DOX) é um glicosídeo antibiótico da classe das antraciclinas. Possui atividade antitumoral contra tumores sólidos e hematológicos (Yeh e Bickford, 2009). A morte de células cancerígenas ocorre devido à ação inibitória exercida pela DOX na enzima topoisomerase 2 $\alpha$  (Top-2 $\alpha$ ), o que promove quebra de cadeias de ácido desoxirribonucleico (DNA) e seu acúmulo na célula. Há produção de radicais livres e ativação de vias de apoptose celular. No cardiomiócito, o processo é o mesmo, contudo, a enzima inibida é a topoisomerase 2 $\beta$  (Top-2 $\beta$ ), como mostrado na figura 1 (Henriksen, 2018).

Outros mecanismos estão associados à cardiotoxicidade, como diminuição de grupos antioxidantes e grupos sulfidril, liberação de aminas vasoativas e função adrenérgica alterada. Há redução da expressão de genes cardíacos específicos, como as proteínas contráteis, causando perda de miofibrilas e redução da função de contração do miocárdio. Função diastólica anormal pode ser causada por diminuição da expressão de adenosinatrifosfatases (ATPase) no retículo sarcoplasmático (Pugazhendhi et al., 2018).

Os desarranjos provocados causam doença semelhante a cardiomiopatia dilatada. Fração de ejeção e contratilidade se encontram reduzidas, com disfunção diastólica concomitante (Chatterjee et al., 2010).

Em humanos, os fatores que aumentam o risco de cardiotoxicidade são: doses cumulativas acima de 300mg/m<sup>2</sup>, idade avançada (mais de 70 anos) ou muito jovem (abaixo de 15 anos), administração de radiação no tórax, aplicação concomitante com drogas citotóxicas (em especial a ciclofosfamida), doença cardíaca preexistente, diabetes mellitus, hipertensão, histórico de infarto há menos de 1 ano (Abeloff et al., 2004). Em cães, os fatores que aumentam o risco de cardiotoxicidade são menos definidos. A cardiotoxicidade é incomum com doses acumulativas inferiores a 240mg/m<sup>2</sup>, e a maioria dos centros de tratamento não ultrapassa 180mg/m<sup>2</sup> (Hallman et al., 2018).

Em gatos, pouco se sabe sobre os fatores de risco, e os efeitos tóxicos são menos associados ao sistema cardiovascular. De acordo com O'Keefe e Schaeffer (1993), gatos podem

apresentar arritmias cardíacas, anorexia, mielosupressão e doença renal. Em estudo retrospectivo realizado por Reiman et al., (2008), as principais complicações em gatos foram sinais do trato gastrointestinal e azotemia. Apenas um dos gatos apresentou doença cardíaca, e não houve relação com o tratamento com DOX. Reiman et al. (2008) ainda pontuam que as doses cumulativas usadas em gatos devem ser menores do que as usadas em cães.

Algumas drogas apresentam efeito cardioprotetor frente à DOX, como a dezzaroxane (DRZ), que pode ser administrada antes do quimioterápico (Hallman et al., 2019). Age competindo pelos sítios de ligação da Top-2 $\beta$  (Lyu et al., 2007). A coenzima Q10 também previne alterações eletrocardiográficas e histológicas ocasionadas pela DOX (Botelho et al., 2020). Além disso, as estatinas já foram associadas à cardioproteção, no entanto, mais estudos são necessários para confirmar os efeitos clínicos (Chatterjee et al., 2010).

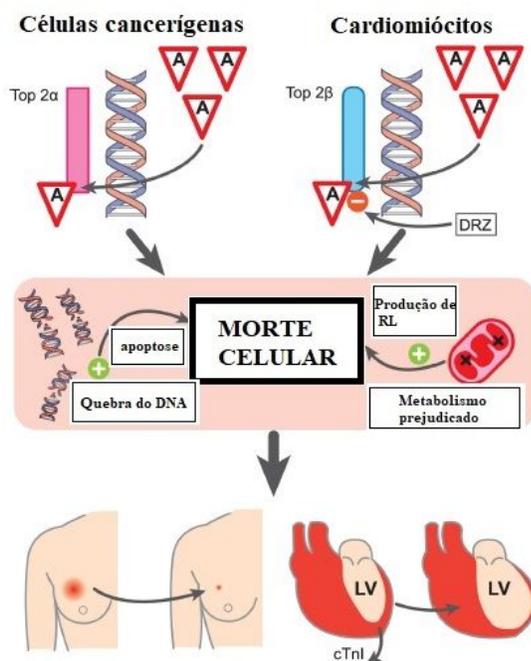


Figura 4. Ação da doxorubicina nas células cancerígenas e nos cardiomiócitos.

A DOX está representada pelo triângulo com a letra “A”, no interior, referente à antraciclina. Nas células cancerígenas, a DOX se liga à Top 2 $\alpha$  e promove quebra das cadeias de DNA. Nos cardiomiócitos, a DOX se liga à Top 2 $\beta$  e promove a quebra das cadeias de DNA, prejudica o metabolismo mitocondrial e aumenta a produção de radicais livres (RL). A dezzaroxane (DRZ) compete com a DOX pelo sítio de ligação na Top 2 $\beta$ . LV: do inglês, *Left Ventricle*, Ventrículo Esquerdo. cTnI: troponina cardíaca I. (Adaptado de Henriksen, 2017).

### 3.5. Sinais clínicos

Em cães, as principais manifestações compatíveis com doença cardíaca são: diminuição de apetite, dificuldade respiratória, tosse, piora de tosse crônica associada à esforço respiratório, diminuição de atividades físicas (Saunders e Gordon, 2015). Ao examinar o animal, podem ser observadas alterações como sopros cardíacos, mucosas cianóticas, edema de membros, abdômen abaulado, cansaço, posição ortopneica e crepitação pulmonar (Borges et al., 2016).

De acordo com Côté (2017), as principais manifestações de doença cardíaca em gatos são taquipneia em repouso e dispneia, que podem estar associadas a edema pulmonar ou efusão pleural. Podem ser observadas alterações na ausculta como sopros, som de galope e arritmias. Os animais podem apresentar sinais de baixo débito, como hipotermia e azotemia pré-renal. Diferente do cão, a taquicardia e a tosse dificilmente estão relacionadas à doença cardíaca, e a bradicardia pode ocorrer em alguns casos. O animal pode chegar ao atendimento veterinário com sinais de tromboembolismo aórtico. A morte súbita pode ser a única apresentação da doença cardíaca em gatos (Abbott, 2010).

### 3.6. Diagnóstico

Além do histórico, exame físico e sinais clínicos, outras ferramentas podem ser empregadas no diagnóstico da IC (Erling e Mazzaferro, 2008).

A radiografia torácica é muito utilizada e é considerada um bom método diagnóstico. As principais alterações são padrão pulmonar intersticial que pode evoluir para padrão pulmonar alveolar, dilatação das veias pulmonares, aumento do átrio esquerdo e deslocamento dorsal da traqueia. Pode ser observada efusão pleural (Buchanan, 2000).

O ECG é importante no paciente cardiopata, pois as arritmias podem causar ou piorar a insuficiência cardíaca (Karaye e Sani, 2008). Distúrbios eletrolíticos, hipertrofia do miocárdio, estiramento atrial, fibrose do miocárdio e cardiomiopatia dilatada são alguns fatores que podem alterar o ritmo do coração (Singh, 1997).

A ECO é um exame não invasivo que permite avaliar a estrutura e função do coração, além de permitir estudo preciso da sua anatomia. A ecocardiografia identifica alterações hemodinâmicas e morfológicas, dando subsídios para a terapêutica do paciente (Kirkpatrick et al., 2007). A IC pode ser caracterizada como sistólica ou diastólica e com fração de ejeção preservada ou diminuída nesse exame (Omar, 2016).

Os peptídeos natriuréticos são encontrados em concentrações séricas elevadas em pacientes humanos portadores de insuficiência cardíaca e podem ser marcadores precoces de doença cardíaca (MacDonald et al., 2008). Estudos têm sido realizados para definir a

importância desses marcadores em cães e gatos com doenças cardiovasculares. Esses peptídeos são liberados após estiramento e tensão do miocárdio, e seus níveis elevados indicam a severidade da doença em várias espécies (Oyama, 2015).

Troponinas cardíacas (cTn) são marcadores sensíveis e específicos de lesão do miocárdio. É uma forma confiável de avaliar a saúde dos cardiomiócitos em cães e gatos. Concentrações séricas normais se correlacionam com bom prognóstico, enquanto as concentrações elevadas são associadas a maior risco de morte (Langhorn e Willesen, 2016).

### 3.7. Tratamento

O objetivo do tratamento da IC difere entre pacientes agudos e crônicos. No caso agudo, deve-se priorizar otimização da função hemodinâmica, enquanto no crônico, é importante modular a ativação neuro-hormonal (Fuentes, 2009).

O tratamento de cães com IC varia com o grau de insuficiência, avaliado pela classificação proposta por Keene et al. (2019). Outro sistema de classificação é usado para cardiomiopatias felinas (Fuentes et al., 2020).

O quadro 2 exemplifica o tratamento da IC de acordo com o seu grau e a apresentação clínica do animal.

Quadro 2. Classificação e tratamento da ICC

<b>Grau de IC</b>	<b>Apresentação clínica</b>	<b>Tratamento</b>
A	Animal com risco de desenvolver IC.	Sem tratamento
B	Dividido em B1 e B2. Animais com alteração cardíaca estrutural. B1 é assintomático e B2 é assintomático com repercussão hemodinâmica.	B1 sem tratamento, apenas acompanhamento. B2 pode fazer uso de ECAi, betabloqueadores
C	Animal com sinais clínicos de IC.	ECAi, pimobendan, furosemida, espironolactona
D	Animal com sinais clínicos de IC e refratário ao tratamento	C + digoxina, centeses, oxigênio, nitroglicerina, dobutamina

Fonte: Adaptado de Keene et al., (2019).

O uso de inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECAi) é bem estabelecido em humanos e animais portadores de IC. A supressão do SRAA melhora a condição clínica e promove longevidade de pacientes (Kvart et al., 2002). Há diminuição da resistência periférica,

prevenção de vasoconstrição e relaxamento da musculatura (Shah et al., 2017). Os ECAi são drogas bem toleradas por cães e gatos, sendo seguros e eficientes a longo prazo (Lefebvre, 2007). Em cães, o enalapril é capaz de retardar o remodelamento cardíaco, diminuindo as dimensões do átrio esquerdo (AE) e da parede do VE em diástole, além de aumentar o tempo de ejeção do VE e a velocidade de encurtamento circunferencial das fibras miocárdicas (Allworth, 1995). O uso parece apresentar maiores benefícios em cães portadores de IC por DMVM e nos estágios II, III e IV de IC (Lefebvre, 2007). Em gatos, há menos estudos comprovando os benefícios do uso de ECAi na IC, mas eles podem aumentar o tempo que a doença permanece controlada, e seu uso concomitante com diuréticos é importante nesta espécie, para reduzir os efeitos do SRAA, que é potencializado na presença de furosemida (Gordon e Cotê, 2015).

Os beta bloqueadores bloqueiam os receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos do coração, prevenindo o remodelamento. Alguns bloqueiam os receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos e  $\alpha_1$ -adrenérgicos, promovendo vasodilatação (Packer et al., 2001). Essas drogas diminuem os efeitos do sistema nervoso simpático no coração, são antioxidantes e antiarrítmicos. Por serem inotrópicos negativos, não devem ser usados em pacientes com doença avançada (Atkins, 2007). Em gatos, são prescritos em cenários específicos, como em obstrução da via de saída do VE com alto gradiente pressórico e em arritmias supraventriculares ou ventriculares (Gordon e Cotê, 2015).

A aldosterona é um mineralocorticoide que aumenta retenção de sódio e pode ter efeitos deletérios como fibrose do miocárdio e injúria vascular. O uso de antagonistas da aldosterona previne o remodelamento cardíaco e o desenvolvimento de arritmias (Weber, 2001). De acordo com estudo realizado por Bernay et al. (2010), o uso da espironolactona em conjunto com o tratamento para DMVM diminui a mortalidade dos cães afetados. Macdonald et al. (2008) não observaram efeitos antifibróticos da espironolactona em gatos com IC por cardiomiopatia hipertrófica, e um terço dos animais do estudo desenvolveu ulcerações faciais com a medicação. Seu uso é reservado para casos em que os gatos estão com hipocalcemia devido ao uso crônico de furosemida (Gordon e Cotê, 2015).

Os diuréticos são utilizados para controlar a retenção de fluidos observada na insuficiência cardíaca e têm efeito anti-hipertensivo (Shah et al., 2017). A furosemida é a droga de escolha para tratar edema pulmonar, efusão pleural e ascite (Fuentes, 2009). É também a única medicação com benefício comprovado em gatos com IC e deve ser usada em todos os casos (Abbott, 2010).

O pimobendan é um medicamento muito utilizado para o tratamento de cães com ICC. Possui efeito inotrópico positivo e é inodilatador. Melhora a capacidade contrátil do miocárdio

e reduz a resistência vascular sistêmica e pulmonar (Fuentes, 2004). Seu uso não é estabelecido em gatos, pois não há segurança. Pode ser empregado em casos de ICC refratários ao tratamento padrão (Gordon e Cotê, 2015).

### 3.8. Glicosídeos cardioativos no tratamento da insuficiência cardíaca

A  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase é uma enzima da superfície celular que mantém o gradiente iônico entre o fluido intracelular e o fluido extracelular. Possui um sítio de ligação específico para os glicosídeos digitálicos (Buckalew, 2015).

Os GCs são componentes semelhantes a esteroides de ocorrência natural. São isolados principalmente de plantas, oriundos de seu metabolismo secundário. Também estão presentes no veneno de sapos (Melero et al., 2000). São compostos por uma porção açúcar (glicosídeo) e uma porção não-açúcar (aglicona-esteróide). O grupo R na posição 17 define a classe de glicosídeo cardíaco. Digoxina (DIG), oleandrina (OLE) e ouabaína (OUA) são consideradas cardenólídeos por possuírem um anel de butirólactona na posição 17 (Figura 5). Pequenas diferenças na estrutura química alteram a toxicocinética e a toxicodinâmica dessas substâncias (Schonfeld et al., 1985; Prassas e Diamandis, 2008). Possuem efeito inotrópico positivo, em função do seu mecanismo de ação que envolve a inibição da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, o que aumenta os níveis intracelulares de sódio iônico ( $\text{Na}^+$ ) e eleva a atividade do trocador de sódio/cálcio ( $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ ), promovendo saída de  $\text{Na}^+$  para o meio extracelular e um maior influxo de cálcio iônico ( $\text{Ca}^{++}$ ) na célula cardíaca, fortalecendo a contração muscular (Ahmed et al, 2009).

A DIG foi descrita pela primeira vez em 1785 e é um metabólito cardiotônico isolado da planta *Digitalis purpurea* (Whayne Jr, 2018). Além do bloqueio da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, em doses baixas, tem efeito inibitório sobre o sistema nervoso simpático e aumenta o tônus vagal, reduzindo a atividade no nó sinoatrial e a condução na junção atrioventricular (Formiga e Ariza, 2018). Foi o GC mais utilizado no tratamento da IC, mas com o surgimento dos moduladores neuro-hormonais, passou a ser uma droga de segunda escolha em pacientes sem arritmias. Nos casos de fibrilação atrial com alta resposta ventricular, a DIG é a primeira escolha terapêutica (Campbell e Macdonald, 2003).

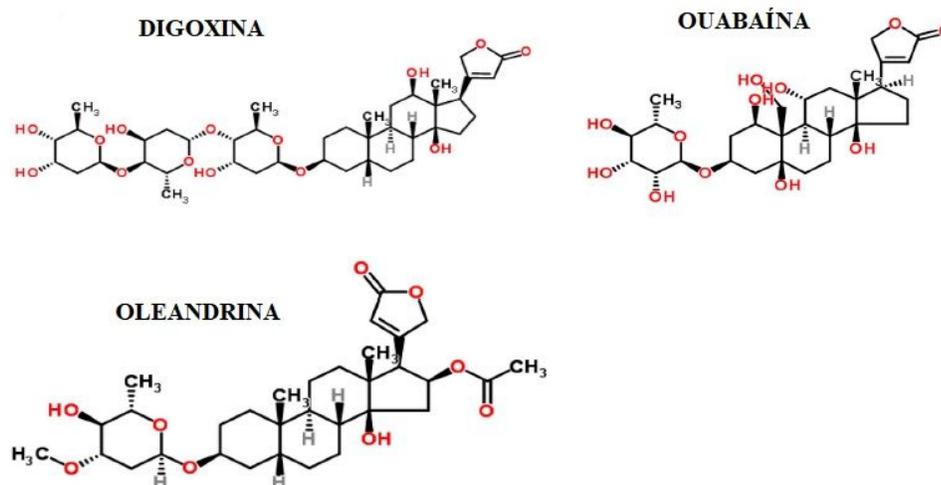


Figura 5. Estrutura química dos cardenolídeos (Fonte: Botelho et al., 2019).

A OLE é um glicosídeo isolado da planta *Nerium oleander*. Todas as partes da planta são consideradas tóxicas. Atua inibindo a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, o que aumenta o inotropismo cardíaco e produz efeitos pró-arrítmicos. Por aumentar o conteúdo intracelular de cálcio, apresenta uma atividade citotóxica elevada, induzindo apoptose em células tumorais, além de inibir a liberação do fator de crescimento de fibroblasto-2. É usada no tratamento de alguns tipos de câncer. A intoxicação por esse composto pode ser letal, e os animais podem apresentar sintomas como diarreia sanguinolenta e alterações cardiovasculares, em especial arritmias (Kumar et al., 2013).

OUA é outra substância cardiotônica que foi descrita como metabólito secundário das plantas *Strophantus sp.* e *Acokanthera sp.*, porém, posteriormente, foi identificada como produto do metabolismo de mamíferos (Hamlyn et al., 1991). É encontrada no plasma de diferentes espécies, como bovinos, roedores e foi isolada no plasma humano por Hamlyn et al. em 1991. De acordo com Hamlyn et al (1991) e Schneider et al (1998), as glândulas adrenais apresentam a maior concentração de OUA no organismo. Estudos indicam que a OUA é um hormônio do estresse, e sua concentração sérica se eleva em diferentes situações fisiológicas e patológicas, como na insuficiência cardíaca congestiva, insuficiência renal, gravidez e pré-eclampsia, hipertensão, hiperaldosteronismo (Manunta et al., 2009; Blaustein e Hamlyn, 2020). Além da atuação inibitória na  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, a OUA pode ter efeito pro-inflamatório ou anti-inflamatório, de acordo com a sua concentração sérica (Cavalcante-Silva et al., 2017).

O mecanismo de ação dos GCs está exemplificado na figura 6.

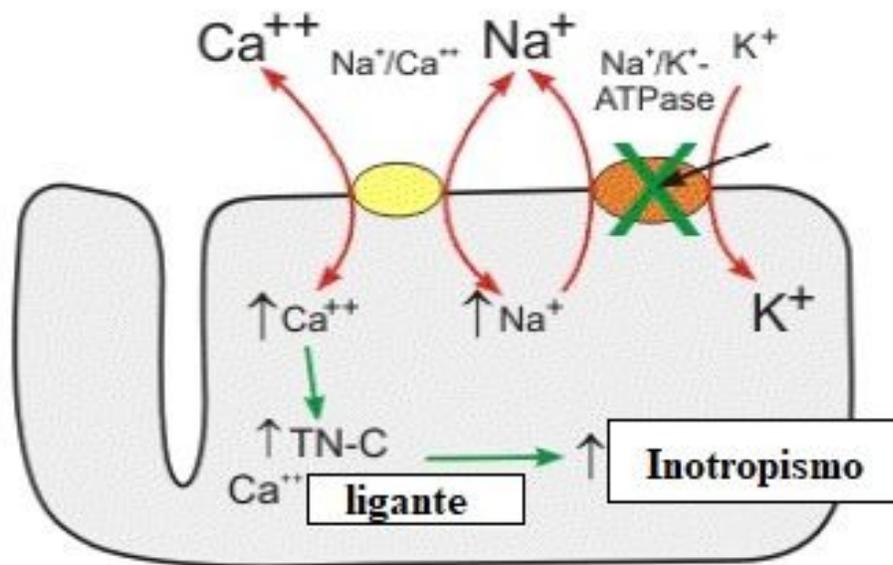


Figura 6. Mecanismo de ação dos glicosídeos cardioativos. (Fonte: Adaptado de Ganpiseti et al., 2014).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Animais e medicamentos

O experimento realizado obteve aprovação no Comitê de Ética do Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), protocolo nº 74/2017, e todos os animais tiveram o seu bem-estar respeitado durante a realização do projeto.

Foram usados 20 machos Wistar adultos e hígidos da espécie *Rattus norvegicus*, com peso médio de 200g, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. Os ratos foram alocados no Laboratório de Toxicologia do Departamento de Clínica e Cirurgia da Escola de Veterinária (EV) da UFMG, sob condições ambientais controladas: temperatura de 25°C, regime de 12h de luz e 12h de escuridão, ração e água *ad libitum*, como mostrado na figura 7.

A DOX utilizada foi a versão comercial presente em hospitais para quimioterapia (Fauldoxo®). Os glicosídeos DIG, OUA e OLE foram adquiridos da Sigma®.



Figura 7. Rato Wistar adaptado ao ambiente após a chegada ao laboratório.  
Fonte: Arquivo pessoal.

#### 4.2. Delineamento experimental

Após a ambientação dos animais no laboratório foi realizado o desafio: a aplicação intraperitoneal (IP) de DOX (Figura 8). Utilizou-se a dose de 12mg/kg, e foi considerado o peso médio dos ratos, o que resultou num volume de 0,48mL do quimioterápico por animal.

No dia seguinte, os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (G) experimentais (n = 5) e receberam o seguinte tratamento por injeção subcutânea (SC): G1 foi tratado com solução salina e denominado controle (CON); G2, com OLE; G3, com OUA; e G4, com DIG. O controle negativo foi obtido em estudos prévios do grupo (Oliveira et al., 2013). A dose foi de 50µg/kg de glicosídeo por animal, o que resultou num volume de 0,14mL. Os animais do G1 receberam apenas 0,14mL de solução fisiológica 0,9%. O tratamento foi realizado todos os dias, no mesmo horário, por sete dias consecutivos.

Antes do desafio proposto, momento chamado de tempo zero (T0), foram realizados os exames ECG e coleta de sangue para hematologia e bioquímica sérica, sob anestesia inalatória em circuito fechado, com o aparelho VetCase, Brasmed®. O anestésico utilizado foi o isoflurano, 2,5% para indução e 1,5% para manutenção.

No dia seguinte, após o T0, foi aplicada DOX em todos os animais. E, no dia seguinte, iniciou-se o tratamento com DIG, OLE e OUA que perdurou por sete dias consecutivos.

No final do tratamento (T1), os animais foram novamente anestesiados (conforme protocolo descrito anteriormente) e realizados exames de ECG, ECO e coleta de sangue para hematologia e bioquímica sérica.

A figura 9 mostra o aparelho de anestesia usado e um dos animais passando pelo procedimento anestésico.



Figura 8. Rato Wistar recebendo aplicação intraperitoneal de doxorrubicina.  
Fonte: Arquivo pessoal.

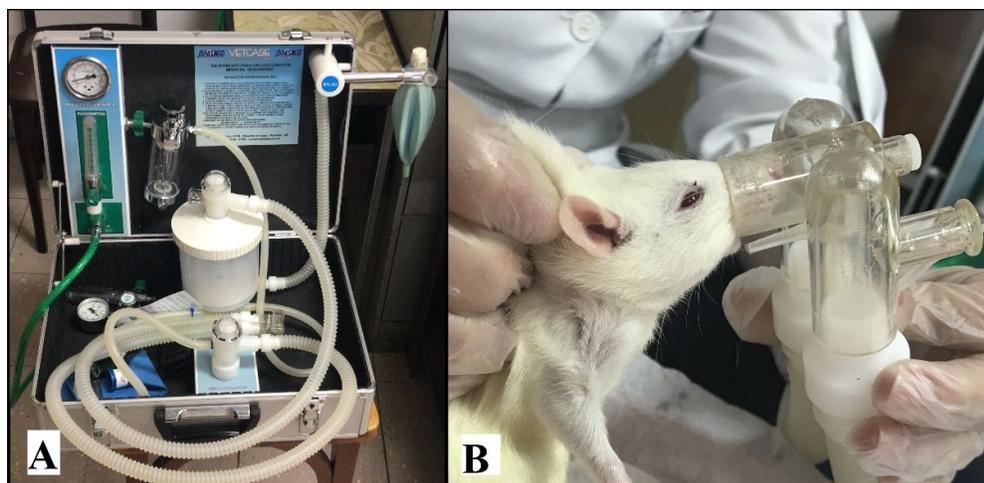


Figura 9. A. Aparelho de anestesia inalatória utilizado no experimento. B. Rato Wistar recebendo anestesia inalatória.  
Fonte: Arquivo pessoal.

#### 4.3. Ecocardiografia

Morfologia e função cardíacas foram avaliadas *in vivo*, de forma não invasiva, no T1. Foi utilizado um sistema de ecocardiografia transtorácica de alta resolução, equipado com transdutores setoriais bifrequenciais de 24 a 30MHz e de 32 a 40MHz (VEVO 2100 VisualSonics, Toronto, Canadá®). Foram avaliados os seguintes índices: diâmetro do

ventrículo esquerdo na diástole (DIAMd), diâmetro do ventrículo esquerdo na sístole (DIAMs), volume do ventrículo esquerdo na diástole (VOLd), volume do ventrículo esquerdo na sístole (VOLs), FC, VS, DC, fração EF e FS.

A avaliação foi feita no modo brilho (modo B) e modo movimento (modo M). As mensurações foram realizadas no modo M, e a fração de ejeção foi obtida pelo método de Teicholz. Os ratos foram posicionados em decúbito dorsal, e as imagens foram obtidas pelas janelas paraesternal esquerda, paraesternal direita e apical.

#### 4.4. Eletrocardiografia

A atividade elétrica do coração foi avaliada *in vivo*, de forma não invasiva, por meio do Eletrocardiógrafo ECGPCVVET-Tecnologia Eletrônica Brasileira S.A®. Os animais foram colocados em decúbito lateral direito, e os eletrodos foram posicionados nos membros: eletrodo amarelo no membro anterior esquerdo, eletrodo verde no membro posterior esquerdo, eletrodo vermelho no membro anterior direito, e eletrodo preto no membro posterior direito (figura 10).



Figura 10. Rato Wistar anestesiado, em decúbito lateral direito e com eletrodos posicionados para realização do eletrocardiograma.

Fonte: Arquivo pessoal.

Dessa forma, foi possível estudar o ECG em seis derivações: aVF, aVL, aVR, D1, D2 e D3. Foi feita avaliação durante 5 minutos, na velocidade de 25mm/s, sensibilidade 1N. O ECG foi realizado no T0 e no T1.

#### 4.5. Exame hematológico

Foram realizadas laparotomia e coleta de sangue via artéria aorta abdominal. Foram coletados 3,0mL de sangue, dos quais 0,5mL foram usados para realização de hemograma. O material foi acondicionado em tubo micro com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 10%. O exame hematológico foi composto por eritrograma, leucograma e contagem de plaquetas e foi realizado no aparelho Poch-100i® e por contagem diferencial em esfregaços sanguíneos corados com Panótico.

#### 4.6. Exames bioquímicos

Foram coletados 3,0mL de sangue, dos quais 2,5mL foram destinados à obtenção de soro e realização de exames bioquímicos. O material foi acondicionado em tubo com ativador de coágulo e centrifugado.

O exame bioquímico compreendeu a dosagem de aspartato aminotransferase (AST), lactato desidrogenase (LDH), troponina I (cTnI), ureia, creatinina e SDMA. Os exames bioquímicos foram realizados no aparelho semiautomático TP Analyser®, utilizando-se kits comerciais da Bioclin®. A cTnI foi avaliada por meio de teste rápido imunoenzimático, semiquantitativo da marca Biocon®, com sensibilidade <0,5 ng/mL. A dimetilarginina simétrica (SDMA) foi avaliada com kit da IDEXX® em equipamento próprio.

#### 4.7. Avaliação histopatológica

Após a laparotomia e coleta de sangue, os animais foram eutanasiados por aprofundamento da anestesia inalatória, em circuito fechado, com o gás isoflurano, com aparelho VetCase, da marca Brasmed®. Em seguida, foram submetidos a necropsia. Fragmentos de coração foram coletados para análise macroscópica e histológica. No Laboratório de Patologia Animal da EV-UFMG, foram feitos cortes de 4µm de espessura, e as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina.

#### 4.8. Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, os dados obtidos foram apresentados na forma de médias e desvio-padrão. Em relação às variáveis quantitativas, foi feito teste de normalidade de distribuição (Kolmogorov-Smirnov), seguido de teste de

análise de variância (ANOVA) e Tukey ( $p < 0.05$ ). Em caso de não normalidade, foram utilizados o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e comparações múltiplas de Dunn. Os dados foram avaliados por meio de *GraphPad Prism 9*. O nível de significância estabelecido foi de  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Seleção dos animais e das doses de medicamentos

Os ratos Wistar foram escolhidos para o experimento, pois são bons modelos para o estudo de doenças cardiovasculares, além de terem baixo custo, curto ciclo reprodutivo e fácil acomodação no ambiente de laboratório. Com esse modelo animal, foi possível estudar o mecanismo patofisiológico de alterações cardíacas e os efeitos de tratamentos medicamentosos experimentais concordando com Doggrell e Brown (1998).

Foi escolhida a DOX para indução de ICC, devido ao seu efeito direto no miocárdio. A dose utilizada foi de 12mg/kg numa única aplicação e, foi baseada no estudo de Oliveira (2013).

Existem vários métodos possíveis para indução de ICC em ratos, como o uso de animais geneticamente modificados, meios farmacológicos, procedimentos cirúrgicos, exercícios, entre outros (Hasenfuss, 1998). O uso da DOX como indutora de ICC já está bem estabelecido na literatura, e existem diferentes abordagens, em que variam as doses usadas, o tempo e a frequência de aplicação. De acordo com O'Connell et al. (2017), a indução pode ser feita por protocolos de curto ou longo prazo, em que animais recebem doses cumulativas diferentes. Como o objetivo do trabalho era o rápido estabelecimento da ICC para avaliar os efeitos terapêuticos dos GCs, foi realizada uma única dose de 12mg/kg, semelhante a outros estudos (Polegato et al., 2015; Zhu et al., 2008).

Botelho (2018) realizou um trabalho que avaliou os efeitos dos glicosídeos DIG, OLE e OUA na fisiologia cardiorrenal de ratos Wistar hípidos. De acordo com esse estudo, a dose de 50µg/kg, aplicada uma vez ao dia por 21 dias, não foi capaz de ocasionar arritmias ou sinais clínicos nos animais tratados. Sendo assim, essa dose foi escolhida para continuar a investigação quanto ao potencial terapêutico desses glicosídeos, bem como estudos a respeito de sua toxicocinética.

### 5.2. Quadro clínico dos animais

Os animais foram avaliados clinicamente durante todo o período do experimento. No segundo dia de tratamento com os GCs, os animais tratados com OLE apresentaram sangramento nasal, o que sugere um quadro de vasculite periférica 48h após a aplicação da DOX.

A partir do terceiro dia de tratamento, foram observadas alterações clínicas em todos os quatro grupos. Os animais apresentaram diarreia, sangramento nasal e ocular,

presença de petéquias e equimoses nos membros, pelos opacos e arrepiados, prostração, diminuição do consumo de água e alimento. As lesões mais intensas foram vistas nos animais tratados com OLE, seguido pelo grupo CON. Os animais dos grupos OUA e DIG apresentaram lesões mais brandas e estavam mais ativos quando comparados aos demais.

No quarto dia de tratamento, um dos animais tratados com DIG veio a óbito. Foi submetido à necropsia e coleta de órgãos.

No quinto dia de tratamento, um dos animais tratados com OLE faleceu e sofreu canibalismo, o que impediu a coleta do coração para avaliação. A partir desse dia, os ratos desse grupo (G2) foram separados.

Após a realização do ecocardiograma, no sétimo dia de tratamento, um dos animais tratados com OUA não retornou da anestesia e faleceu.

Como no experimento realizado por Botelho (2018), a dose de  $50\mu\text{kg}$  dos glicosídeos OLE, OUA e DIG não foi capaz de causar alterações clínicas ou óbito, e já se conhece o perfil tóxico da DOX, supõe-se que as manifestações observadas sejam devidas a esse quimioterápico (Figura 11). Contudo, é importante observar que alguns sinais manifestados, em especial referentes ao trato gastrointestinal, podem ter sido ocasionados pelos GCs, uma vez que são achados comuns na intoxicação por digitálicos. Além disso, a própria ICC causa pela DOX pode ter agravado esses sinais clínicos.

De acordo com Rangel et al. (2009), a toxicidade da DOX pode se manifestar no sistema gastrointestinal ocasionando vômitos, diarreia do intestino delgado e, em casos mais graves, colite hemorrágica. Nos ratos desse estudo, foi observada diarreia sanguinolenta, com presença de muco, o que pode ser um quadro de colite hemorrágica. Stein et al. (2010) relatam que a diarreia pode ser induzida por quimioterapia.

Além disso, a trombocitopenia é um efeito colateral observado com frequência em pacientes tratados com DOX e ocorre tanto por supressão medular como por lise plaquetária (Kim et al., 2009). O menor número de plaquetas pode ser responsável pelas petéquias, equimoses e sangramentos espontâneos observados. Aharon et al. (2013) demonstraram que a DOX também apresenta efeitos tóxicos na vasculatura, promove ativação da coagulação e agregação plaquetária, contribuindo para o consumo desses fatores e desordens hemostáticas, como foi observado clinicamente. Os achados clínicos são compatíveis com os exames hematológicos dos animais, nos quais houve trombocitopenia acentuada.

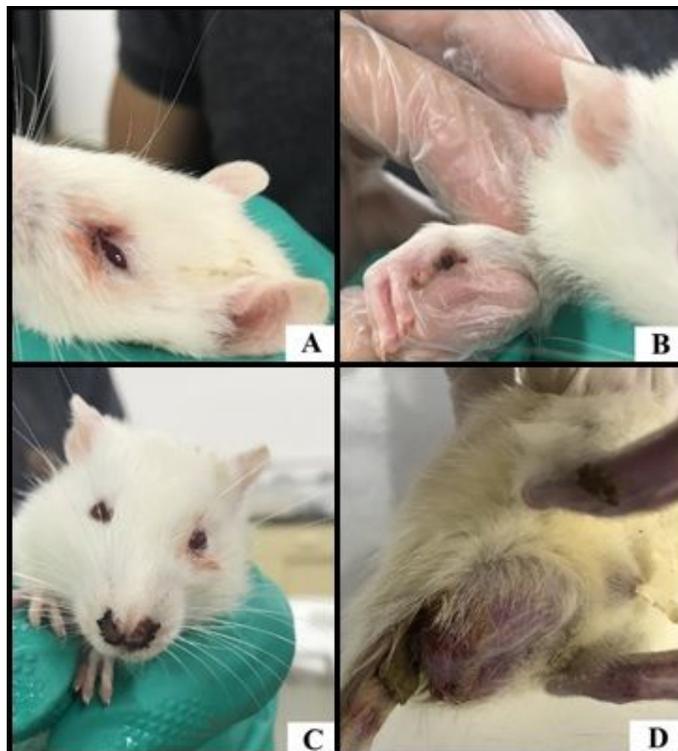


Figura 11. Apresentação dos sinais clínicos em ratos Wistar utilizados no experimento: A: Sangramento ocular. B. Equimose no membro anterior direito. C. Sangramento nasal. D. Diarreia. Fonte: Arquivo pessoal.

A partir das alterações observadas, é possível perceber que houve sucesso na indução da ICC, o que foi comprovado posteriormente por meio dos exames hematológicos, bioquímicos, ECG e ECO.

### 5.3. Ecocardiografia

No presente experimento, os valores de referência utilizados a título de comparação são de 15 ratos Wistar saudáveis submetidos à ECO em estudos prévios do grupo (Oliveira, 2013), como mostrado na tabela 1.

Comparando os resultados médios obtidos com os valores de referência, não houve alteração da FC, do DIAMs e do VOLs. Percebe-se que houve redução da EF, da FS, do VS e do VOLd em todos os grupos avaliados. O DC foi menor em todos os grupos, exceto no G2, tratado com OLE. O DIAMd também foi menor do que o valor de referência, com exceção do CON, tratado com salina, embora próximo do limite inferior. Houve diferença estatística entre os grupos para os índices de DC, DIAMd, VOLs e VS, mostrando que a distribuição desses parâmetros não foi uniforme entre os tratamentos.

Tabela 1. Intervalo de referência dos parâmetros ecocardiográficos de ratos Wistar hígidos

<b>Parâmetro ecocardiográfico</b>	<b>Intervalo de referência</b>
<b>Débito cardíaco (DC)</b>	68,42 ± 7,90
<b>Fração de ejeção (EF)</b>	65,49 ± 4,25
<b>Fração de encurtamento (FS)</b>	37,34 ± 3,17
<b>FC (bpm)</b>	345,00 ± 20,00
<b>Volume sistólico (VS)</b>	197,95 ± 22,59
<b>Diâmetro do ventrículo esquerdo em diástole (DIAMd)</b>	7,55 ± 0,51
<b>Diâmetro do ventrículo esquerdo em sístole (DIAMs)</b>	4,74 ± 0,52
<b>Volume do ventrículo esquerdo em diástole (VOLd)</b>	304,66 ± 46,31
<b>Volume do ventrículo esquerdo em sístole (VOLs)</b>	106,71 ± 27,31

Por meio dos resultados obtidos, percebe-se que a IC foi induzida com sucesso, uma vez que todos os animais apresentaram valores de EF e FS abaixo do normal. Os diferentes tratamentos propostos não foram capazes de otimizar esses parâmetros. Como amplamente difundido na literatura, a ICC induzida pela DOX é capaz de causar redução da EF e da FS (Neto et al., 2006; Gava et al., 2016; Giorgiadis et al., 2020),

Nessa pesquisa ficou evidenciado que a DOX causa alterações morfológicas e funcionais no coração que se assemelham à CMD. Pode haver dilatação das câmaras cardíacas, com paredes mais finas, diminuição da EF do VE e redução da contratilidade (Chatterjee et al., 2010). A ecocardiografia é uma forma precoce de avaliar as alterações cardíacas induzidas pela DOX (Hanai et al., 1995; Gava et al., 2016). Mensurar a EF do VE é a principal estratégia para monitorar os danos causados por antineoplásicos, especialmente por ser um método acessível e não invasivo. As antraciclinas são capazes de causar injúria ao miocárdio imediatamente após a exposição (Plana et al., 2014).

A FC observada em todos os ratos esteve dentro da faixa de normalidade. Embora a indução da ICC tenha sido feita com uma dose cumulativa de DOX elevada em única aplicação, o objetivo foi de mimetizar a ICC crônica. A ICC reduz a atividade vagal e eleva o tônus simpático, aumentando a FC. Pacientes com FC elevada em repouso possuem pior prognóstico. Contudo, o incremento da FC só ocorre nas fases mais avançadas da ICC (Hori e Okamoto, 2012), o que explica uma FC média normal observada nos animais do estudo. De acordo com levantamento realizado por Lourenço et al. (2016) que avaliaram a FC de 564 pacientes humanos hospitalizados por IC aguda, portadores ou não de ICC, a FC não se eleva em todos os casos.

O DIAMd foi menor nos animais tratados com OLE, OUA e DIG. Apenas os animais do grupo CON mantiveram o DIAMd com valores dentro do limite de normalidade. O esperado é que o DIAMd esteja maior após o tratamento com DOX, o que é compatível com as alterações provocadas pela CMD. Os grupos tratados apresentaram diminuição dos parâmetros em relação ao controle, é possível que os glicosídeos OLE, OUA e DIG tenham contribuído para diminuir o remodelamento excêntrico. A diferença ( $p < 0,05$ ) observada em ter os grupos CON x OLE e CON x DIG mostram que esses dois GCs tiveram um efeito de hipertrofia mais acentuado, o que sugere um possível efeito protetivo à dilatação do miocárdio após a aplicação de DOX.

O DIAMs se manteve dentro dos valores de normalidade. A DOX age diretamente nos cardiomiócitos, deprimindo a função cardíaca e resultando num fenótipo de CMD. O DIAMs e o DIAMd tendem a estar aumentados (Mathew et al., 2017). Ocorre hipertrofia excêntrica do coração, resultando em redução da espessura das paredes e dilatação das câmaras (Ferreira Filho, 2012). De acordo com Marchandise et al. (1989), o remodelamento e a disfunção cardíaca ocorrem num período variável, o que pode explicar o DIAMs sem alterações. Além disso, Mathew et al. (2017), colocaram o aumento do DIAMd como um critério diagnóstico, no guia da Sociedade Britânica de Ecocardiografia para diagnóstico da CMD. Quanto maior o valor do DIAMd, maior a sensibilidade para o diagnóstico. Ressalta-se que os autores não mencionaram a importância do DIAMs. Contudo, Wess et al. (2017) colocaram o DIAMd como parâmetro importante para diagnóstico da CMD em cães da raça Doberman, o que pode indicar uma diferença entre as espécies com relação à essa variável. Num estudo que avaliou o ECO de 30 pacientes humanos após quimioterapia com DOX, não houve alterações no DIAMs, quando se comparou os exames antes e após o tratamento (Markiewicz et al., 1980). No trabalho de Polegato (2011), que induziu IC em ratos com uma única dose de 20mg/kg de DOX e

realizou o ECO 48 horas após, também foi encontrada redução das dimensões do VE na diástole. Pondera-se que os resultados são variáveis na literatura.

Outro índice que não sofreu variações foi o VOLs. Os grupos OLE e DIG apresentaram VS e VOLd significativamente inferior ao CON, demonstrando que essas drogas prejudicaram a capacidade de ejeção e o enchimento do VE. Como esses grupos apresentaram DIAMd significativamente menor do que o CON, isso pode ter contribuído para uma redução do volume comportado na cavidade ventricular, afetando o VOLd e, conseqüentemente, o VS. Além disso, o VS é um parâmetro intimamente relacionado à EF e ao DC, que também estavam reduzidos. Num trabalho realizado por Silva e Camacho (2005), que avaliou o ECO de cães submetidos ao tratamento com DOX ao longo de 168 dias, observou-se alterações no VOLs apenas a partir da 10ª semana de tratamento, o que demonstra que esse é um parâmetro que demora a sofrer modificações. Além disso, a redução do volume ejetado pode ter aumentado o volume residual no coração (Polegato, 2011).

A FS, a espessura da parede do ventrículo esquerdo e a massa ventricular esquerda se encontraram dentro da normalidade no grupo tratado com OUA, o que permitiu concluir que essa dose foi capaz de prevenir ou retardar o remodelamento cardíaco. Esse grupo também apresentou diminuição do DIAMd, porém não foi significativo. Apresentaram valores de EF e FS mais elevados do que os demais grupos, o que sugere que a contratilidade e a capacidade de ejeção tenham sido menos afetadas nesse grupo. Isso também é respaldado pela melhor apresentação clínica desses animais quando comparados aos demais grupos. O G3 apresentou valor maior de VS, porém, sem diferença significativa em relação ao CON, OLE e OUA, demonstrando que as condições de pré-carga, pós-carga e contratilidade, determinantes do VS, não foram diferentes das de um animal que não recebeu tratamento.

Nas figuras 12 e 13, está a representação gráfica dos resultados ecocardiográficos obtidos.

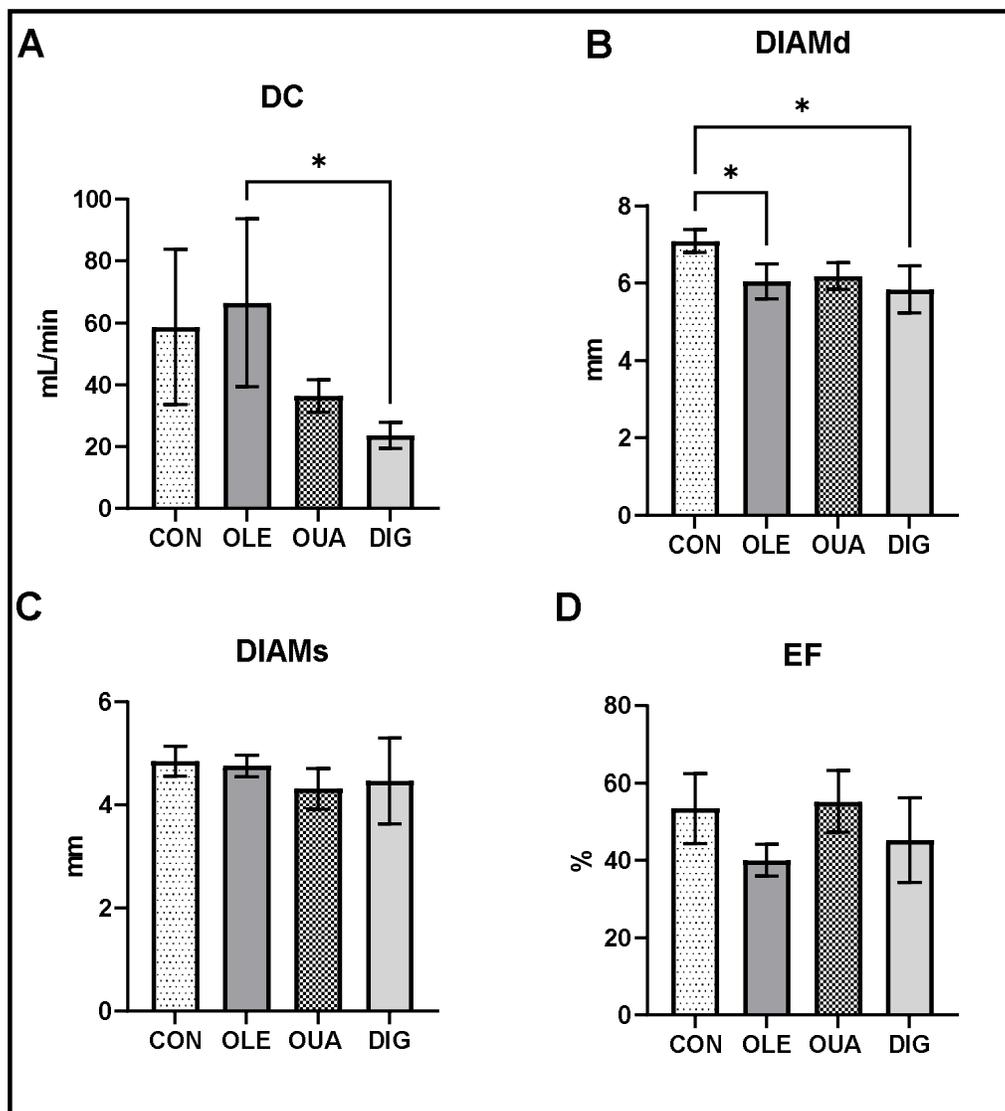


Figura 12. Média e desvio-padrão dos parâmetros ecocardiográficos de ratos desafiados com doxorubicina e tratados com salina, oleandrina, ouabaína e digoxina.

A. Débito cardíaco (DC) em mL/min. B. Diâmetro do ventrículo esquerdo na diástole (DIAMd) em mm. C. Diâmetro do ventrículo esquerdo na sístole (DIAMs) em mm. D. Fração de ejeção (EF) em %.

\*  $p < 0,05$ .

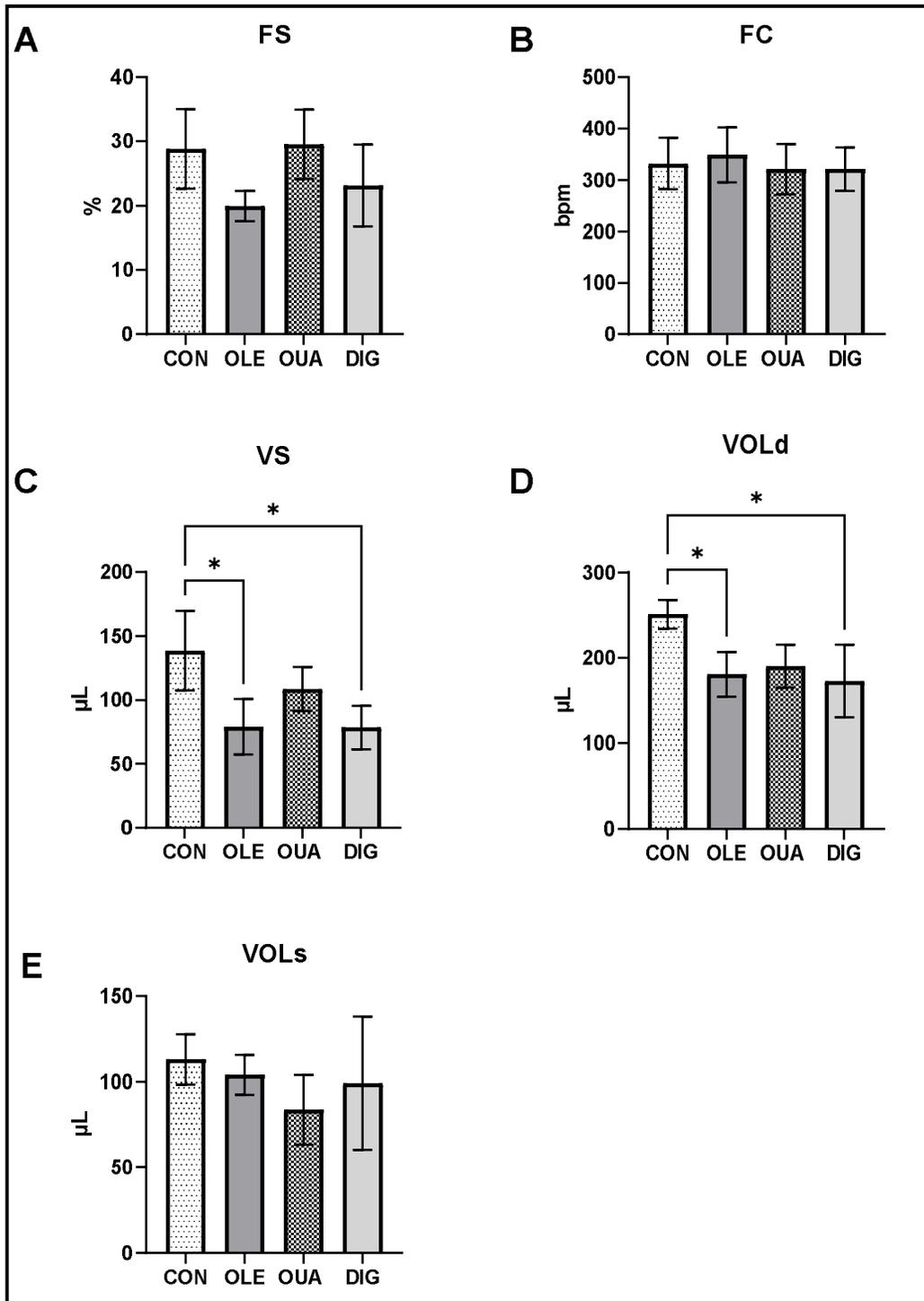


Figura 13. Média e desvio-padrão dos parâmetros ecocardiográficos de ratos desafiados com doxorubicina e tratados com salina, oleandrina, ouabaina e digoxina

A. Fração de encurtamento (FS) em %. B. Frequência cardíaca (FC) em bpm. C. Volume sistólico (VS) em  $\mu\text{L}$ . D. Volume do ventrículo esquerdo na diástole (VOLd) em  $\mu\text{L}$ . E. Volume do ventrículo esquerdo na sístole (VOLs) em  $\mu\text{L}$ .

\*  $p < 0,05$ .

A OUA é um glicosídeo que se apresenta em concentrações séricas elevadas na hipertensão arterial sistêmica e está implicada no aumento da resistência vascular periférica (Pierdomenico et al., 2001). Essa ação pode ser explicada pelo efeito inibitório que exerce na bomba de sódio e potássio a nível do endotélio vascular ou por estimular o sistema nervoso simpático. Esses efeitos podem contraindicar a droga para seu uso na ICC, uma vez que pode levar a hiperatividade simpática e aumento da pós-carga. É uma substância que parece estar diretamente envolvida na disfunção cardíaca, mas seu mecanismo exato ainda não foi elucidado (Jiang, et al. 2007). Diversos estudos que avaliaram os efeitos da OUA, de forma isolada, nos parâmetros ecocardiográficos, encontraram resultados semelhantes tanto em seres humanos como em animais. Níveis elevados de OUA implicam redução da dimensão do ventrículo esquerdo em diástole, redução do VS, redução do DC, redução das EF e FS, como observado nos animais do G3. Em contrapartida, causam aumento da espessura da parede do ventrículo esquerdo (Pierdomenico et al., 2001; Jiang et al. 2007; Simonini et al., 2015), também observado nos animais do G3. Isso pode se dever ao aumento da pós-carga. Os trabalhos citados utilizaram doses cumulativas elevadas ou avaliaram pacientes com disfunção cardíaca avançada, que está correlacionada a níveis maiores de OUA. Wu et al. (2015) conduziram um experimento no qual ratos foram submetidos à constrição aórtica e consequente sobrecarga de pressão e foram tratados com 50 $\mu$ /kg/dia de OUA por quatro semanas.

O DC encontrado no G2 foi normal, o que mostra que a OLE pode ter efeitos terapêuticos para a manutenção do DC em indivíduos com ICC, quando comparada à DIG, pois a diferença estatística foi encontrada entre esses dois grupos. O CON apresentou o segundo maior valor de DC, mas abaixo do valor de referência. OUA e DIG apresentaram valores baixos de DC. A administração de OLE é superior ao tratamento com DIG para manutenção do DC na ICC. O incremento da contratilidade promovido pela OLE pode ter sido responsável pelos resultados obtidos.

Poucos trabalhos relatam na literatura os efeitos da OLE no ECO de animais e humanos. A maioria dos trabalhos se refere aos efeitos pró-arrítmicos da droga. O experimento realizado por Deavers et al. (1979) avaliou os efeitos da OLE na contratilidade cardíaca de cães hípidos, e observou aumento da pressão de enchimento do VE e aumento da contratilidade, dose-dependente. Já Smith, Aldridge e Kittleson (2003), ao realizarem ECO num muar acidentalmente intoxicado por extratos de OLE, observaram apenas diminuição do diâmetro do VE.

No grupo tratado com DIG, não houve melhora da EF, da FS, do VS ou do DC. Foi observada redução do DIAMd, o que provavelmente se deve à hipertrofia. Embora seja uma droga amplamente utilizada e com efeitos benéficos comprovados, não se mostrou eficaz frente à ICC induzida por DOX. Possivelmente, pelo fato de os animais estarem em estágio inicial da doença, não se beneficiaram da DIG, apresentando maiores efeitos deletérios.

A DIG é uma droga com o uso bem estabelecido na IC causada por disfunção sistólica. É indicada para pacientes com persistência dos sintomas após o tratamento com outras drogas e em casos de fibrilação atrial com alta resposta ventricular. É capaz de melhorar a EF, reduzir a resistência vascular sistêmica e diminuir a pressão de enchimento do VE (Dec, 2003). Num estudo randomizado que comparou a DIG ao placebo em pacientes com ICC (Lee et al., 1982), demonstrou-se que a DIG diminuía as taxas de hospitalização, reduzia os sintomas, mas não melhorava a mortalidade dos pacientes. Zhou et al. (2020) ponderam que estudos desse porte foram realizados antes do estabelecimento de drogas mais apropriadas para o tratamento da ICC, como os moduladores neuro-humorais e os betabloqueadores. Ao avaliar 372 pacientes humanos com EF reduzida e tratados com DIG, Zhou et al. (2020) observaram pior prognóstico e maior mortalidade. Já no trabalho de Malik et al. (2019), pacientes com EF reduzida que pararam de receber a DIG, apresentaram maior taxa de hospitalização e mortalidade. Os dados são conflitantes. Em experimento realizado por Neves et al. (2017), ratos hígidos tratados com DIG apresentaram espessamento das paredes do VE, demonstrando que essa droga, de forma isolada, pode causar hipertrofia cardíaca.

A figura 14 demonstra as imagens do modo B e do modo M da ecocardiografia realizada durante o experimento.

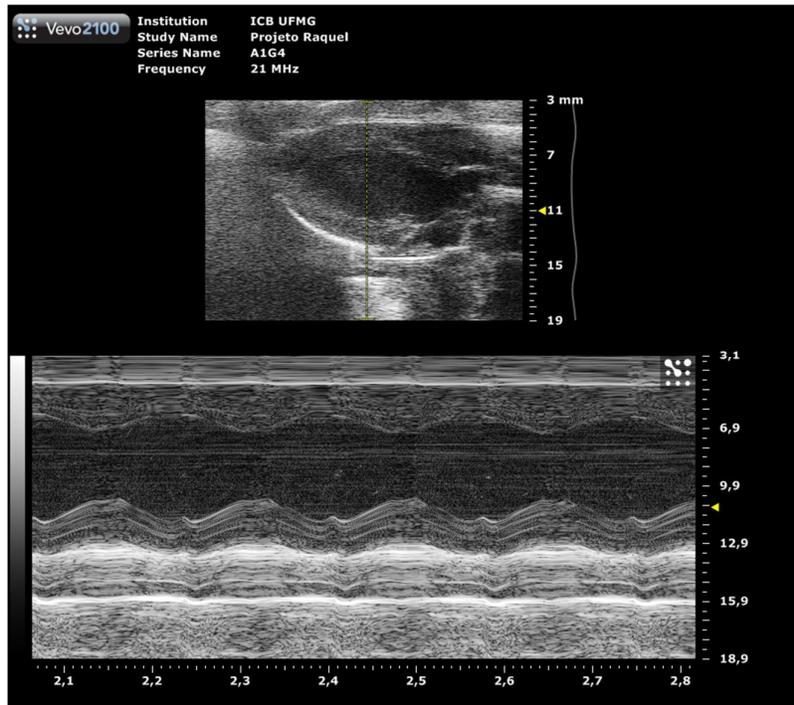


Figura 14. Imagem ecocardiográfica de um rato desafiado com doxorrubicina e tratado com oleandrina. A imagem acima da figura dp modo B, mostra corte longitudinal do ventrículo esquerdo. A imagem abaixo, é do modo M, do corte longitudinal do ventrículo esquerdo.

#### 5.4. Eletrocardiografia

Antes de tratamento com DOX e indução de ICC, todos os animais apresentaram ECG sem alterações, com ritmo sinusal, ondas e complexos dentro da morfologia, duração e amplitude esperadas para a espécie (Botelho et al., 2019), como mostrado na tabela 2 e na figura 15.

Para fins de comparação, foram considerados os valores de ECG determinados por Botelho et al. (2019). No referido estudo, a FC mais elevada foi de 378bpm. Contudo, há grande variação desse parâmetro na literatura. Dessa forma, a FC após o tratamento com os GCs foi comparada à FC antes do tratamento.

Houve prejuízo na avaliação dos ECGs por limitações do método usado, o que impossibilitou a realização de análise estatística dos mesmos. Sendo assim, os dados estão apresentados na forma de média e desvio-padrão e foram comparados entre si.

Após a indução da ICC e o tratamento com os GCs OLE, OUA e DIG, não foram observadas arritmias. Contudo, comparando os exames antes e após o uso das drogas, é possível perceber que houve aumento da duração do complexo QRS em todos os grupos (figura 16). A amplitude da onda T e a duração do intervalo QT estavam acima do normal

apenas no grupo CON (figura 17). A FC média foi maior do que o intervalo de referência nos tratados com DIG, o que sugere que esse GC não apresentou um bom efeito neuromodulador, ou seja, não foi capaz de aumentar a atividade parassimpática no coração. Os grupos tratados com OLE e OUA apresentaram FC média dentro da normalidade, semelhante ao CON. O efeito neuromodulador de OLE e OUA não parece satisfatório, uma vez que o comportamento da FC nesses grupos foi igual ao do grupo que não recebeu tratamento.

A OLE é capaz de reduzir a FC por ação direta do GC no coração (Langford e Boor, 1996) e também por meio de efeitos autonômicos (Rezhakani e Mahan, 1992), o que pode ter contribuído para a manutenção da FC dentro da normalidade nesse grupo. De acordo com Wallick et al. (1984), a OUA é capaz de acentuar os efeitos parassimpáticos no coração, o que pode ter ocasionado a FC dentro do intervalo de referência.

O aumento da duração do intervalo QT e amplitude da onda T apenas no CON demonstram que houve maior prejuízo à função ventricular nesse grupo. O prolongamento do intervalo QT pode ocorrer em condições de hipóxia ou na hipercalemia, assim como o aumento da amplitude da onda T. É possível que as lesões miocárdicas tenham dificultado o suprimento de oxigênio para os tecidos e para o próprio coração, impactando o ECG. Como os níveis séricos de  $K^+$  não foram mensurados, não é possível definir a real causa da anormalidade observada. Além disso, efeitos diretos da DOX nos cardiomiócitos podem levar a aumento do intervalo QT e do QRS (Villani, 1986).

Embora o exame eletrocardiográfico não seja o mais indicado para a avaliação de sobrecarga de câmaras, ele é capaz de sugerir essas alterações. Aumento na duração do complexo QRS pode sugerir sobrecarga do VE, além de bloqueio de ramo direito, alterações compatíveis com isquemia e ICC. A ICC foi confirmada pelo exame ecocardiográfico realizado nos ratos e por sua apresentação clínica. O prolongamento do QRS também tem correlação com redução da função sistólica do VE (Murkosfky, et al., 1998). De acordo com Greig et al. (2014), intervalo QRS prolongado é uma alteração eletrocardiográfica que se correlaciona positivamente com o desenvolvimento de ICC.

A normalidade do intervalo QT nos ratos dos grupos OLE, OUA e DIG pode ser explicada pelo efeito direto dos GCs na atividade elétrica do coração. O uso dos digitálicos foi capaz de manter o tempo de atividade ventricular dentro do normal. Intervalo QT prolongado predispõe à ocorrência de arritmias ventriculares, o que torna o

quadro clínico mais grave. Sendo assim, houve um efeito benéfico no ECG com o uso das drogas digitálicas. Os GCs, ao inibirem a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, aumentam o conteúdo intracelular de  $\text{Ca}^{++}$ , alterando o potencial de ação e, conseqüentemente, o ECG. O potencial de ação apresenta encurtamento da fase 2 ou platô. Já no ECG, é possível observar encurtamento do segmento QT (Stemmer e Tai Akera, 1988). Woodbury e Hecht (1952) observaram os efeitos da DIG no potencial de ação das células ventriculares de sapos e relataram importante redução das fases 2 e 3. Os autores sugerem que a redução na duração do potencial de ação não interfere no tempo de contração do ventrículo, mas se correlaciona com o infradesnivelamento do segmento ST. Aumento nas doses de DIG intensificam os achados relatados.

Muitos estudos avaliam os efeitos dos GCs no potencial de ação e na contração muscular. Os trabalhos afirmam que existem outros mecanismos pelos quais os GCs são capazes de agir no coração, sem necessariamente bloquear a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Le Grand et al. (1990) demonstraram que a OUA é capaz de agir exclusivamente nos canais de  $\text{Ca}^{++}$  rápidos e nos canais de  $\text{Ca}^{++}$  lentos. Ruch et al. (2003) isolaram miócitos ventriculares de gatos e avaliaram o efeito elétrico de diferentes GCs, dentre eles, a OUA, que foi capaz de reduzir a duração do potencial de ação. Ainda de acordo com Ruch et al. (2003), o aumento de inotropismo pelos GCs ocorre até certo ponto, no qual o excesso de  $\text{Ca}^{++}$  se torna tóxico, pois supera a capacidade de armazenamento do retículo sarcoplasmático, o que leva a contrações espontâneas e incoordenadas.

Os estudos acerca dos medicamentos digitálicos e seus efeitos no ECG são antigos e recorrentes na literatura. Pick (1957) ponderou que os digitálicos podem ocasionar praticamente qualquer distúrbio na geração ou propagação do impulso e classificou os seus efeitos como terapêuticos, excessivos e tóxicos. A redução da frequência ventricular em fibrilação atrial e a conversão de arritmias atriais em ritmo sinusal são os desdobramentos terapêuticos. Dissociação AV e bloqueios do NSA são excessivos. Já os tóxicos compreendem complexos ventriculares prematuros, bigeminismo ventricular, taquicardia ventricular e fibrilação ventricular. Os efeitos tóxicos são esperados quando há uso de doses elevadas dessas drogas. Os GCs também causam alterações no segmento ST, uma vez que causam vasoconstrição e redução do fluxo coronário, gerando distúrbios de oxigenação (Dhein et al., 1990). Tais alterações não foram observadas no presente experimento.

Camplesi et al. (2017), ao avaliarem cães intoxicados com extratos de OLE, observaram diminuição da FC, bloqueio atrioventricular (BAV) de primeiro e de segundo

grau, complexo ventricular prematuro e taquicardia ventricular. As mesmas arritmias são observadas com OUA e DIG (Small et al., 1971; Rosen et al., 1973; Pincus, 2016; Menezes-Filho et al., 2019).

Botelho (2018), ao tratar ratos hígidos com OLE, OUA e DIG na dose de 50µg/kg, observou diminuição da amplitude da onda T nos indivíduos tratados com DIG. Arritmias e demais alterações significativas na amplitude e duração das ondas eletrocardiográficas não ocorreram.

Tabela 2. Parâmetros eletrocardiográficos de ratos Wistar hígidos no tempo zero

Parâmetros	Média ± Desvio-padrão	Mín.	Máx.
FC (bpm)	401,1± 13,18	344	467
P (ms)	28,49 ± 2,85	23	38
P (mV)	0,030 ± 0,005	0,02	0,051
PR (ms)	42,83 ± 3,74	30	68
QRS (ms)	40,43 ± 7,51	28	65
R (mV)	0,130 ± 0,014	0,011	0,191
T (mV)	0,023 ± 0,008	0,012	0,051
QT (ms)	73,14 ± 8,434	57	88

Frequência cardíaca (FC), duração da onda P (Pms), amplitude da onda P (PmV), duração do segmento PR (PRms), duração do complexo QRS (QRSms), amplitude da onda R (RmV), amplitude de onda T (TmV), duração do intervalo QT (QTms), valores mínimos (Mín.) e valores máximos (Máx).

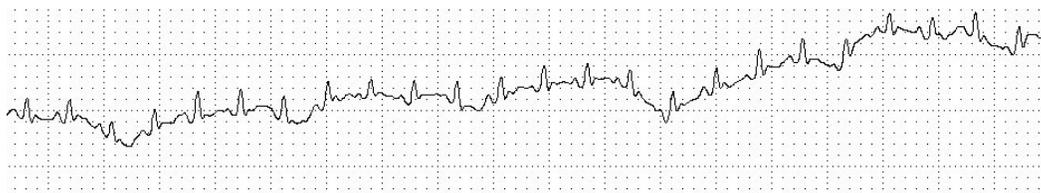


Figura 15. Eletrocardiograma de um rato antes do desafio com doxorubicina e tratamento com os glicosídeos cardioativos. ECG mostrando ritmo sinusal, na derivação D2, a 25mm/s, sensibilidade N.

Os valores obtidos após o tratamento estão detalhados na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros eletrocardiográficos de ratos Wistar desafiados com doxorubicina e tratados com salina, oleandrina, ouabaína e digoxina.

Parâmetros	G1 (CON)	G2 (OLE)	G3 (OUA)	G4 (DIG)
<b>FC (bpm)</b>	369,25 ± 23,82	361,25 ± 31,55	391,40 ± 35,38	406 ± 27,88
<b>P (ms)</b>	30,75 ± 5,110	33,75 ± 1,299	32,80 ± 4,16	32 ± 5,83
<b>P (mV)</b>	0,0485 ± 0,0175	0,061 ± 0,0170	0,042 ± 0,014	0,055 ± 0,015
<b>PR (ms)</b>	44 ± 2,91	51,50 ± 10,80	50,40 ± 5,12	50 ± 6,67
<b>QRS (ms)</b>	53,75 ± 20,35	49,25 ± 10,42	47,20 ± 9,45	46,25 ± 9,28
<b>R (mV)</b>	0,176 ± 0,078	0,084 ± 0,049	0,093 ± 0,025	0,191 ± 0,085
<b>T (mV)</b>	0,12 ± 0,055	0,042 ± 0,025	0,030 ± 0,009	0,068 ± 0,021
<b>QT (ms)</b>	106,25 ± 20,47	91,50 ± 11,58	94 ± 13,007	87,75 ± 11,32

Frequência cardíaca (FC), duração da onda P (Pms), amplitude da onda P (PmV), duração do segmento PR (PRms), duração do complexo QRS (QRSms), amplitude da onda R (RmV), amplitude de onda T (TmV), duração do intervalo QT (QTms).

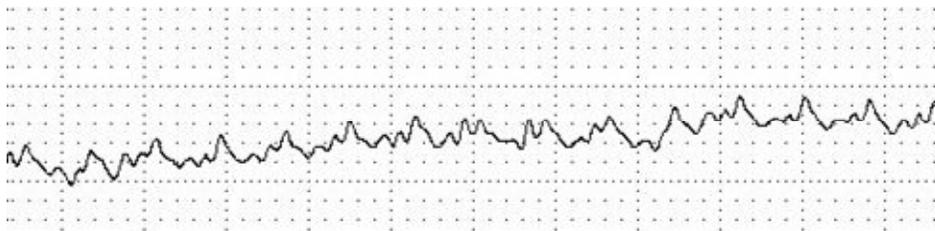


Figura 16. Eletrocardiograma de um rato Wistar após desafio com doxorubicina e tratamento com ouabaína. Observa-se ritmo sinusal, alongamento do complexo qrs, na derivação d2, velocidade de 25mm/s, sensibilidade n.

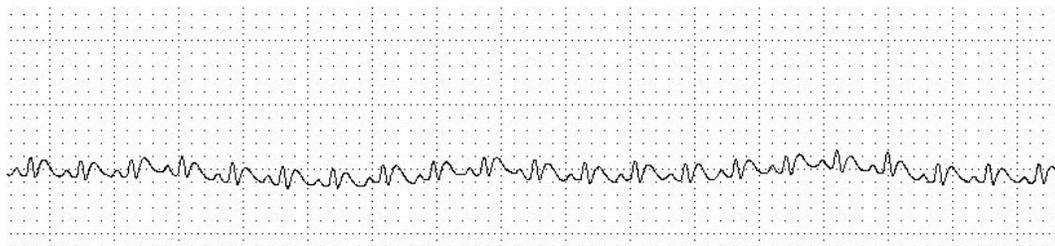


Figura 17. Eletrocardiograma de um rato Wistar do grupo controle após desafio com doxorubicina. Observa-se ritmo sinusal, com aumento da amplitude da onda t e prolongamento do intervalo qt, na derivação d2, a 25mm/s, sensibilidade n.

### 5.5. Hematologia

Os parâmetros hematológicos foram alterados pela DOX em todos os grupos. Os G2, G3 e G4 também sofreram influência da administração de OLE, OUA e DIG, respectivamente.

Para efeitos de comparação, os valores de normalidade do hemograma utilizados foram retirados de Thrall et al. (2015). De acordo com essa referência, as reduções nos parâmetros de hemograma de ratos só são consideradas relevantes quando maiores do que 10%. Todavia, não foi relatado o mesmo para os aumentos dos parâmetros. Logo, aumentos discretos foram considerados importantes.

A contagem de eritrócitos (ERI) e o hematócrito (Ht) estavam dentro dos valores normais, com exceção do G3, tratado com OUA, que apresentou valor médio de Ht acima do intervalo de referência. Nenhum dos animais desenvolveu quadro de anemia. A hemoglobina (Hb) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) estavam maiores em todos os grupos. O volume corpuscular médio (VCM) também se encontrou normal, estando reduzido apenas no G4, tratado com DIG. A hemoglobina corpuscular média (HCM) se elevou no CON e G4, tratado com DIG.

A DOX causa peroxidação das células vermelhas e da membrana lipídica de vários tipos celulares. Também pode causar oxidação da hemoglobina e ter efeito hemolítico (Shinohara e Tanaka, 1980). Além disso, liga-se ao DNA das células, produz radicais livres e induz apoptose (Richardson e Johnson, 1997). Sua administração está associada à mielossupressão, ocasionando principalmente granulocitopenia, anemia e trombocitopenia. As alterações são proporcionais à dose e ao tempo de exposição (Carvalho et al., 2009).

Botelho (2018), ao avaliar e comparar os efeitos de DIG, OLE e OUA no hemograma de ratos Wistar hípidos, observou aumento de Hb e presença de hemácias microcíticas em todos os grupos. Os animais desafiados com a DOX e, em seguida, tratados com os glicosídeos também apresentaram elevação da Hb, e apenas o G4, tratado com DIG, apresentou redução do VCM. Concentrações elevadas de CHCM, que mensura a concentração de Hb por ERI e Hb livre, estão associadas à hemólise. A hemólise pode ter sido induzida previamente pela DOX, uma vez que o grupo CON, que não recebeu tratamento, também apresentou elevação dos mesmos parâmetros.

Akthar et al. (2014) ofereceram extrato de folhas de *Nerium oleander* para dois grupos de ratos, *ad libitum*, por três e por sete dias, respectivamente. Ao avaliarem os

parâmetros hematológicos e compará-los ao grupo controle, houve elevação na contagem de ERI, Hb, Ht e VCM. Isso não foi observado no G2, pois apenas a Hb estava elevada.

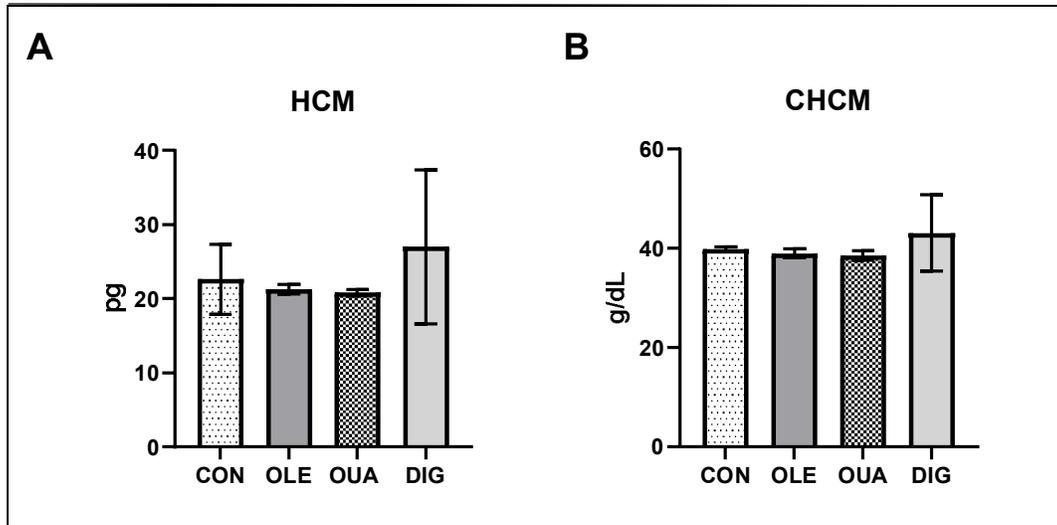


Figura 18. Média e desvio-padrão dos parâmetros hematológicos de ratos Wistar desafiados com doxorubicina e tratados com salina, oleandrina, ouabaína e digoxina.

A. Hemoglobina corpuscular média (HCM) em picogramas (pg). B. Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) em gramas por decilitro (g/dL)

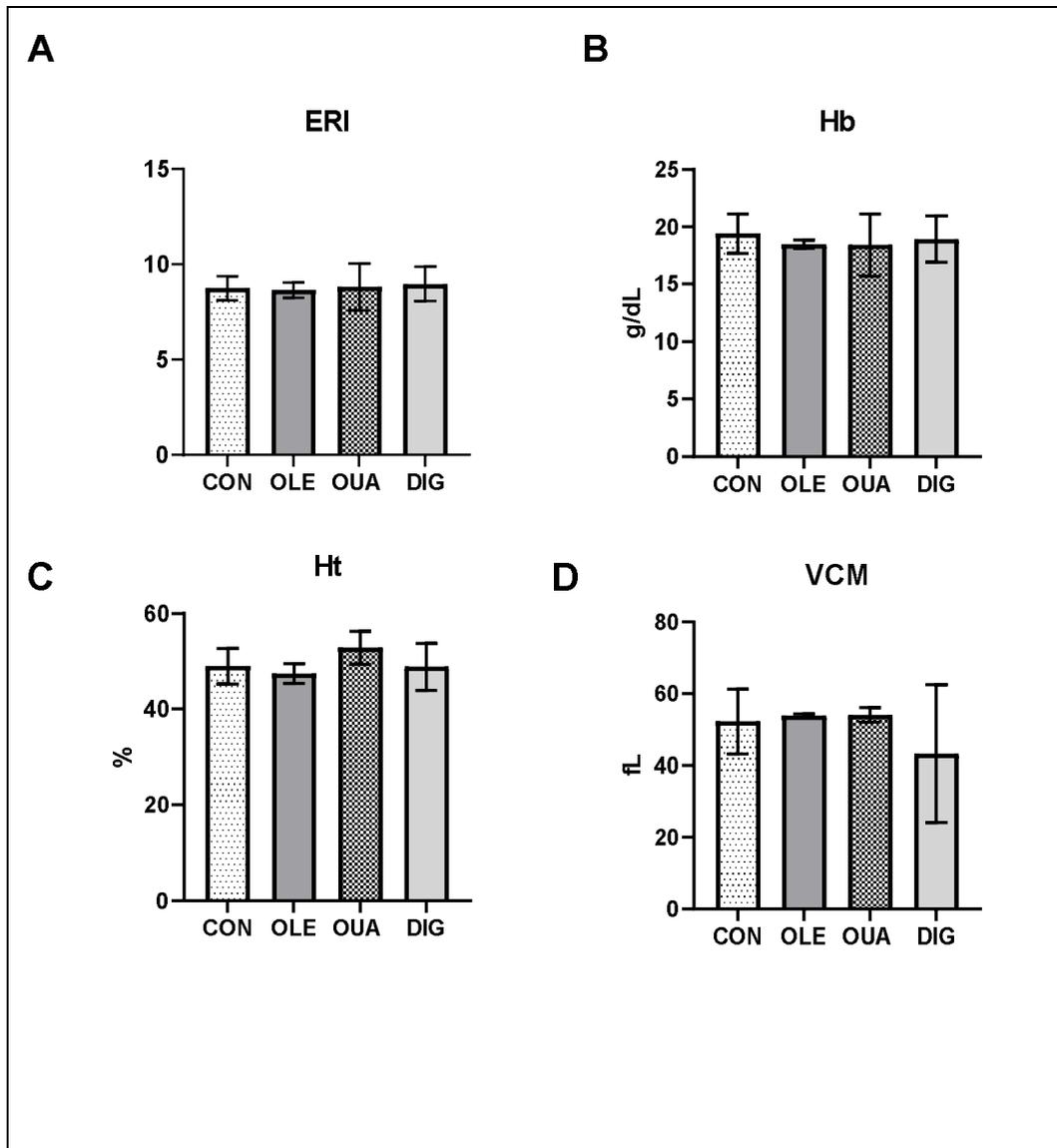


Figura 19. Média e desvio-padrão dos parâmetros hematológicos de ratos desafiados com doxorubicina e tratados com salina, oleandrina, ouabaína e digoxina. A. Eritrócitos (ERI). B. Hemoglobina (Hb). C. Hematócrito (Ht). D. Volume corpuscular médio (VCM).

Os ERI também possuem  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATpase}$  em sua membrana, o que permite que os GCs consigam se ligar a ela. No estudo realizado por Smith et al. (1972), OUA e DIG mostraram grande capacidade de ligação com os eritrócitos. Outros estudos também demonstram que existe essa afinidade (Post et al., 1960; Lindenmayer et al., 1974). De acordo com Hou et al. (2004), a ligação dos glicosídeos pode causar danos oxidativos aos ERI.

O HCM mensura a quantidade média de Hb nos eritrócitos. O seu aumento nos grupos CON e DIG mostra que houve maior dano oxidativo às hemácias desses grupos. Os danos nos animais do CON são explicados pela ação da DOX. DIG apresentou maior valor de HCM, assim como foi o único a apresentar redução do VCM. Hinderling (1984) demonstrou que há importante capacidade de ligação da digoxina às células vermelhas e à Hb e consequente dano celular, o que pode ser responsável por ruptura de hemácias e diminuição do seu tamanho. Van Boxtel et al. (1985) mensuraram o sódio e o potássio dos ERI de pacientes tratados com digoxina e observaram altos níveis de sódio e baixos níveis de potássio, que se correlacionaram com pacientes com sinais de toxicidade da droga. É possível inferir que OUA e OLE não agravaram os danos ocasionados pela DOX.

OUA apresentou elevação do Ht, assim como relatado por Botelho (2018). Embora a OUA iniba a  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$  e bloqueie a síntese celular, em determinados tipos celulares, ela é capaz de estimular a proliferação, como em células nervosas (Cone et al., 1977) e células eritroleucêmicas (Bernstein et al., 1976). Outra possibilidade para o aumento do Ht é a desidratação e a má oxigenação acarretada pela ICC, que estimula a produção de células vermelhas.

Não houve alteração no desvio da amplitude de ERI (RDW-SD) ou no coeficiente da variação da amplitude de ERI (RDW-CV).

As PLT sofreram redução drástica em todos os grupos, o que é explicado pela aplicação de DOX. Os ratos tratados com OLE, OUA e DIG apresentaram menor contagem plaquetária quando comparados aos CON, o que sugere um efeito negativo desses glicosídeos ou sinergismo com a DOX. No presente estudo, a OLE não foi capaz de elevar as concentrações plaquetárias, e os animais desse grupo tiveram o menor número de plaquetas, sugerindo uma ação deletéria nessas células. Botelho (2018) encontrou valores elevados de PLT em ratos tratados apenas com OLE. Taheri et al. (2012) trataram coelhos com doses subletais de extrato de *Nerium oleander* e observaram redução na contagem de PLT. Já Abdou et al. (2019), ao tratarem dois grupos de ratos com 100mg/kg e 200mg/kg, respectivamente, relataram elevação nas contagens plaquetárias em ambos os grupos. Os autores ponderam que o aumento do número de PLT pode ter ocorrido por estímulo inflamatório. As diferenças entre as contagens observadas na literatura podem se dever à diferença entre as doses aplicadas.

A OUA é capaz de aumentar a capacidade de agregação das PLT com o colágeno e trombina, tendo um efeito de ativação sobre essas células *in vitro* e *in vivo* (Prodouz et al., 1987; Lees et al., 1989; Roevens e Courcelles, 1990). Botelho (2018) observou

redução no número de PLT em animais tratados exclusivamente com OUA. Não foram encontrados outros trabalhos a respeito da contagem de PLT sob o efeito de OUA. A redução da concentração de PLT no plasma pode ser explicada pelo deslocamento para interação com os tecidos.

Young et al. (1966) relataram o terceiro caso de trombocitopenia induzida por DIG. Medenica et al. (1972) também observaram trombocitopenia numa paciente idosa intoxicada por DIG e o retorno à contagem normal de PLT após tratamento da intoxicação. A DIG possui potencial para ativar PLT *in vitro* e em pacientes com fibrilação atrial (Chirinos et al., 2005; Pastori et al., 2018). Esses fatores, associados à aplicação prévia de DOX, podem ter contribuído para a trombocitopenia acentuada.

Em todos os grupos foi observada redução do volume médio de plaquetas (VPM) e diminuição do percentual de plaquetas grandes (P-LCR). Esses achados são explicados pelos efeitos dos GCs nas plaquetas, citados acima, e pelo efeito oxidante da DOX nas suas membranas celulares, promovendo lesão e redução do tamanho. A amplitude de variação do tamanho plaquetário (PDW) foi normal nos grupos CON e OLE, contudo, maior no CON. Nos grupos OUA e DIG, houve redução do PDW, indicando maiores danos às PLT nesses grupos. Botelho (2018) também encontrou níveis menores de PDW em ratos tratados apenas com DIG, na dose de 50µg/kg.

Houve redução na contagem total de leucócitos (LEU) em todos os grupos, o que se deve aos efeitos da DOX. Neutrófilos (NEU) se encontraram abaixo dos valores de referência em todos os grupos. O mesmo aconteceu com os linfócitos (LINF), com diminuição em todos os grupos. Com relação aos eosinófilos (EOS), houve redução da contagem em todos os grupos, com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo CON e OLE.

De acordo com De Vasconcelos et al. (2011), a OUA é capaz de aumentar a migração de LEU para os tecidos, em especial os NEU, e reduzir sua concentração sérica. Também é capaz de reduzir a produção de LINF, o que explica a redução significativa desses tipos celulares no grupo tratado com OUA. Além disso, OUA apresenta efeito sinérgico com a hidrocortisona, induzindo apoptose de LINF do tipo T (Rodrigues-Mascarenhas et al., 2003) e é capaz de diminuir a produção de LINF tipo B na medula óssea (de Paiva et al., 2011). A OLE reduz a expressão de interleucinas (IL) responsáveis pela produção de ciclo-oxigenase 2 (COX-2), tendo ação anti-inflamatória e reduz o estímulo mitótico para a produção de LIF (Dey, 2020), o que explica a redução mais significativa de NEU e LINF nesse grupo.

Esposito (1985) demonstrou que ratos tratados com DIG na dose de 4 $\mu$ g/kg e desafiados com patógenos pulmonares apresentaram pior resposta imunológica por terem sua capacidade de migração de LEU reduzida. Em outro estudo realizado posteriormente, em pacientes humanos, Esposito et al. (1988) observaram resultados diferentes: não houve redução da capacidade dos polimorfonucleares em responder a substâncias quimiotáticas. McGill et al. (2019) observaram que a DIG é capaz de reduzir a expressão de uma IL responsável por migração de LEU em bovinos infectados pelo vírus sincicial respiratório, o que reduziu a inflamação pulmonar nesses animais. Os dados são conflitantes, e pode haver variação de resposta do sistema imunológico à DIG em diferentes espécies.

Perez et al. (1988) relataram que o fator ativador de plaquetas (PAF) causa eosinofilia em ratos e que a DOX é capaz de diminuir a magnitude dessa eosinofilia. Como os GCs OLE, OUA e DIG têm capacidade de modular e ativar plaquetas, poderiam aumentar a contagem de EOS. Contudo, o efeito da DOX foi preponderante e houve redução do número desse tipo celular. A diferença foi significativa apenas entre a OLE e o CON, mostrando que esse GC é capaz de reduzir de forma expressiva a contagem de EOS absolutos (abs) quando comparado a animais que não receberam nenhum tratamento. Pode ter havido efeito sinérgico entre a DOX e a OLE na diminuição de eosinófilos.

Resultados dos índices plaquetários e leucocitários estão representados nas figuras 20 e 21, respectivamente.

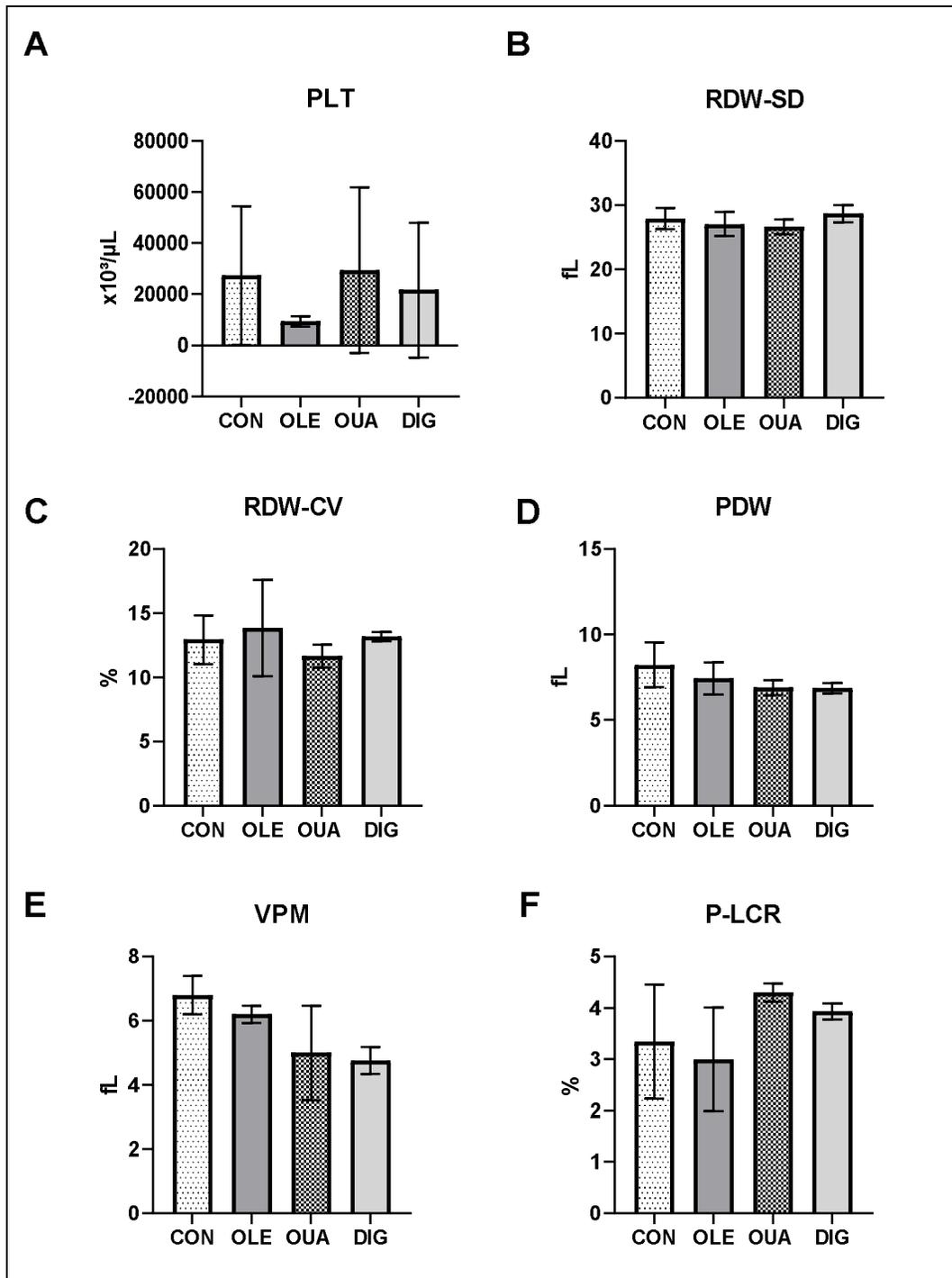


Figura 20. Média e desvio-padrão dos parâmetros hematológicos e plaquetários de ratos desafiados com doxorrubicina e tratados com salina, oleandrina, ouabaína e digoxina.

A. Número de plaquetas (PLT). B. Desvio-padrão da amplitude de destruição dos eritrócitos (RDW-SD). C. Coeficiente da amplitude de destruição dos eritrócitos (RDW-CV). Amplitude de variação do tamanho das plaquetas (PDW). E. Volume plaquetário médio (VPM). F. Percentual de plaquetas grandes (P-LCR).

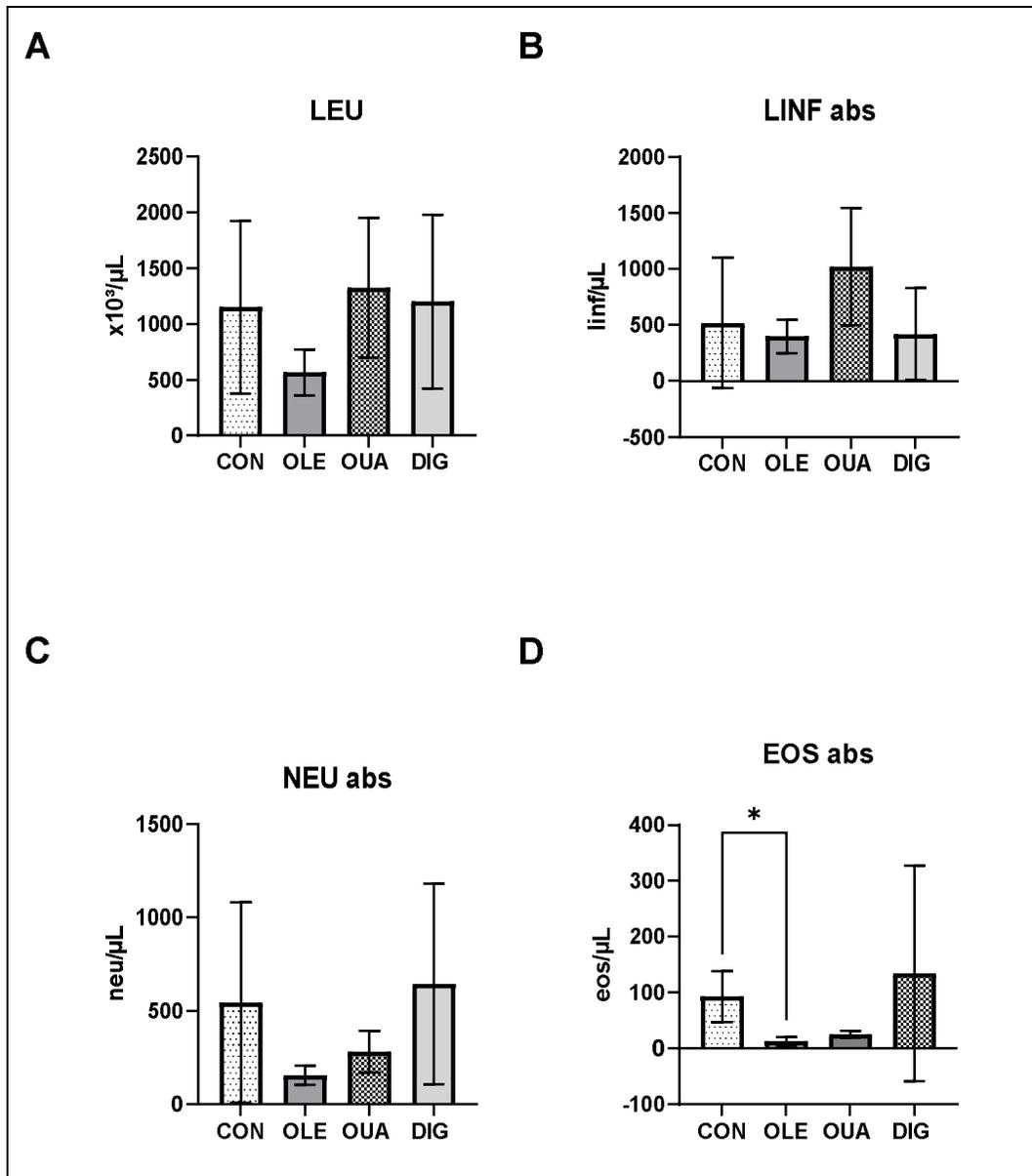


Figura 21. Média e desvio-padrão do leucograma de ratos desafiados com doxorubicina e tratados com salina, oleandrina, ouabaína e digoxina.

A. Número total de leucócitos (LEU). B. Linfócitos absolutos (LINF abs). C. Neutrófilos absolutos (NEU abs). D. Eosinófilos absolutos (EOS abs).

\*diferença estatística em que  $p < 0,05$ .

## 5.6. Bioquímica sérica

Alguns resultados da bioquímica sérica foram afetados pela DOX e pelos GCs.

Os níveis séricos de creatinina estavam normais em todos os grupos, bem como os níveis de SDMA. A ureia estava com concentrações elevadas em todos os grupos, assim como as enzimas AST e LDH, importantes marcadores de lesão miocárdica e de musculatura esquelética. Apenas um animal do grupo tratado com DIG apresentou resultado positivo para cTnI. O teste utilizado no presente experimento para detecção de cTnI acusa resultados positivos quando as concentrações da proteína são superiores a 0,5ng/mL, o que pode explicar os resultados negativos. O animal tratado com DIG pode ter apresentado valores maiores por uma variação individual.

Não houve diferença estatística dos parâmetros bioquímicos avaliados entre os grupos, como mostrado na figura 22.

Como os animais foram avaliados por um curto período, com doses terapêuticas dos GCs, talvez não tenha havido tempo suficiente para o desenvolvimento de alterações renais detectáveis pela creatinina, por exemplo, pois os níveis séricos estavam dentro do normal. Entretanto, sabe-se que variações na estrutura renal já são indicativas de insulto no órgão, e não necessariamente se correlacionam com variações nos níveis séricos de creatinina. Os valores de SDMA também não se alteraram.

A ureia elevada pode ser um indicativo de injúria renal, pois é excretada pelos rins. No entanto, sua excreção não é totalmente renal e é um marcador que também depende de outros fatores, como o estado volêmico do paciente, doenças hepáticas, alterações gastrintestinais e idade. Sua elevação por causa renal ocorre quando há comprometimento de 75% da função do órgão, assim como a creatinina. Quando ocorre elevação de ureia, sem aumento de creatinina, o mais provável é que haja um quadro de desidratação, que promove maior reabsorção de ureia, sem alteração significativa da TFG, mantendo os níveis de creatinina dentro da normalidade (Higgins, 2016). Nos animais do estudo, é provável que o aumento da ureia sérica se deva à desidratação, que foi constatada clinicamente.

Nos ratos desafiados com DOX e tratados com salina, OLE, OUA e DIG, a creatinina sérica se encontrou dentro dos valores de referência. Botelho (2018), empregando a dose de 50µg/kg dos glicosídeos OLE, OUA, DIG, uma vez ao dia, por três semanas, em ratos hígidos, encontrou elevação nos valores de creatinina sérica. Isso não foi observado no presente estudo. Se houve qualquer tipo de dano renal, o mesmo não pôde ser identificado pela mensuração da creatinina.

Embora a DOX tenha efeitos tóxicos mais deletérios ao coração, ela é capaz de causar danos a outros órgãos em decorrência de sua atividade oxidativa. Alterações renais têm sido observadas em pacientes tratados com essa droga (Nagai, 2017). Elsherbiny e El-Sherbiny (2014) trataram ratos com DOX por três semanas, oferecendo uma dose cumulativa de 21mg/kg, e encontraram valores elevados de ureia e creatinina, assim como em outros estudos (Ayla et al., 2011; Su et al., 2015; Afsar et al., 2020). Contudo, a nefrotoxicidade não ocorre em todos os casos e está associada ao uso crônico da droga (Yemm et al., 2019).

Em casos de intoxicação por DIG, a função renal pode estar comprometida. Os níveis de séricos de creatinina de pacientes intoxicados tendem a ser mais elevados (Marik e Fromm, 1998; MacLeod-Glover et al., 2016). Contudo, nem sempre disfunções renais estão presentes (Kirilmaz et al., 2012). A DIG já foi correlacionada com melhora da função renal em pacientes tratados a longo prazo (Testani et al., 2013). Poucos trabalhos correlacionam a OLE diretamente à função renal. A maioria dos relatos de efeitos do glicosídeo ou de intoxicação retratam alterações em outros sistemas. Dey (2020) descreveu que a OLE é capaz de causar alterações cardíacas, inflamação pulmonar, necrose hepática e desordens circulatórias. A OUA está relacionada à excreção de sódio a nível renal e está envolvida na fisiologia da hipertensão essencial em humanos (Manunta et al., 2010). Ainda de acordo com Hamlyn e Manunta (2015), a OUA, além de causar hipertrofia cardíaca, é capaz de induzir fibrose renal na doença renal crônica (DRC).

SDMA é uma molécula oriunda do metabolismo intracelular de proteínas e é excretada majoritariamente pelos rins. Acredita-se que sua excreção seja 90% renal. Possui correlação negativa com a taxa de filtração glomerular (TFG) e correlação positiva com a creatinina. Elevações nos níveis séricos de SDMA indicam dano renal e são um marcador mais precoce do que a creatinina (Relford et al., 2016).

Speranza et al. (2013) correlacionaram a redução da enzima responsável pela síntese de óxido nítrico com piora da função renal e níveis mais elevados de SDMA em pacientes com ICC aguda após o tratamento.

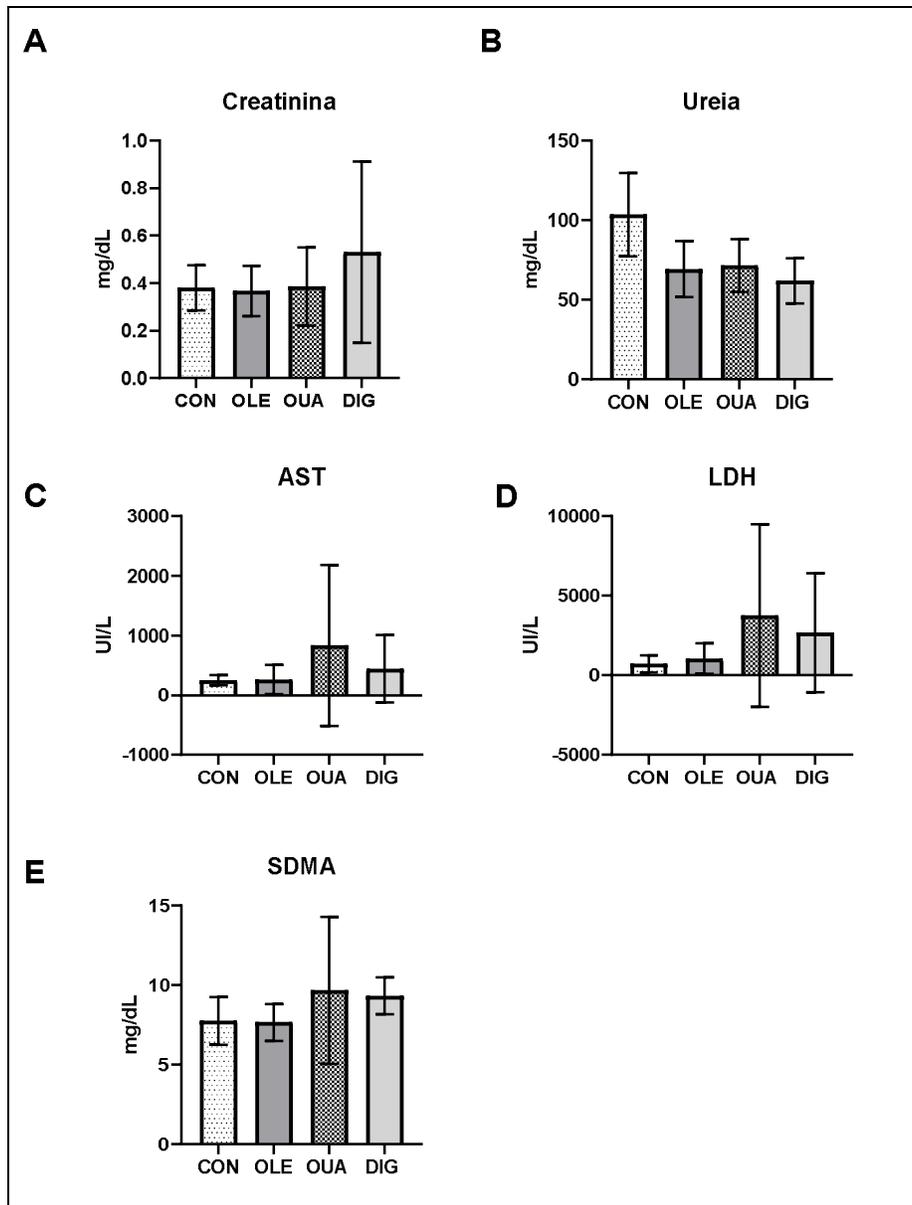


Figura 22. Média e desvio-padrão dos parâmetros bioquímicos de ratos desafiados com doxorubicina e tratados com salina, oleandrina, ouabaína e digoxina. A. Creatinina. B. Ureia. C. Aspartato aminotransferase (AST). D. Lactato desidrogenase (LDH). E. Dimetilarginina simétrica (SDMA).

Uma única aplicação de DOX é capaz de reduzir a quantidade de citocromo P-450 e glutatona no fígado de ratos, o que favorece lesões hepáticas (Marchand e Renton, 1984). AST e LDH são enzimas de extravasamento presentes nos hepatócitos e nas células musculares esqueléticas e cardíacas. Há aumento da sua concentração sérica quando algum desses tipos celulares é lesionado (Thrall et al., 2015). Bethesda (2018) afirma que os danos hepáticos ocasionados por DOX costumam ser moderados e

autolimitantes e que os aumentos de AST ocorrem em cerca de 40% dos pacientes. De acordo com Nishimura et al. (1986), a meia-vida da AST em ratos é de cerca de 13 horas. Nos grupos CON e OLE, não houve alterações nos valores de AST, o que pode ser decorrente da curta meia-vida dessa enzima. Apesar de ser um dado conflitante com a literatura, Dey (2020) observou efeitos hepatoprotetores da OLE.

Botelho (2018) relatou níveis elevados de AST em ratos tratados com OUA. Logo, o aumento observado pode ser um efeito direto do glicosídeo. Graf e Peterlik (1976) demonstraram que a OUA é capaz de aumentar a produção de bile no fígado de ratos, o que indica uma ação direta dessa substância no órgão. Bethesda (2018) afirmou que há pouca metabolização hepática de DIG e que essa droga praticamente não afeta a atividade de citocromo P-450. Níveis maiores de AST podem indicar também maior dano ao tecido cardíaco.

De acordo com Hrelia et al. (2002), a DOX causa elevação nos níveis de LDH quando cerca de 1/3 da defesa antioxidante da célula cardíaca é consumida. Holmgren et al. (2015) observaram elevação de LDH dois dias após sua aplicação em pacientes humanos. A DOX pode ser a responsável pelos aumentos em todos os grupos. Botelho (2018), comparando os efeitos de OLE, OUA e DIG, encontrou LDH acima do valor de referência apenas nos grupos tratados com OLE e OUA. No presente trabalho, os aumentos foram mais expressivos no grupo da OUA e da DIG. Por ter efeitos tóxicos no coração e no fígado, OLE é implicada no aumento de LDH em vários trabalhos (Abdou et al., 2019; Zhou et al., 2019; Ceci et al., 2020). Ren et al. (2006) observaram que a OUA é capaz de lesionar o endotélio vascular e causar aumento de LDH. E, Karadeniz et al. (2008) observaram elevação de LDH em cães intoxicados por DIG.

A troponina cardíaca (cTn) é uma proteína presente no músculo cardíaco e esquelético, que medeia a interação entre o cálcio e o complexo actina-miosina na contração muscular (Sharma et al., 2004). Existem pequenas diferenças entre aminoácidos das troponinas cardíacas e das de musculatura esquelética, o que permite sua distinção em exames laboratoriais. Também existe mais de uma isoforma dessa proteína. A isoforma avaliada foi a I (cTnI), exclusiva da musculatura cardíaca. A cTnI é liberada pelo miocárdio após um período de isquemia e morte celular (Park et al., 2017). De acordo com Polena et al. (2005), os níveis de cTnI sofrem pouca alteração após a administração de DOX, sendo um indicativo ruim de cardiotoxicidade nessas circunstâncias. Após mensurar cTnI em 31 pacientes humanos tratados com DOX, os valores obtidos foram inferiores a 0,3ng/mL. Adamcova et al. (2019) também observaram que a DOX ocasionou

pouca elevação de cTnI na corrente sanguínea, embora tenha sido responsável por alterações histológicas nos cardiomiócitos.

Botelho (2018), utilizando a dose de 50µg/kg de OLE, OUA e DIG, também não encontrou resultados positivos de cTnI. A OLE pode causar aumento de cTnI em ratos, porém, com doses mais elevadas do glicosídeo (Khordadmehr e Nazifi, 2018). A DIG não causa aumento de cTnI (Tharwat e Al-Sobayil, 2014). Moseley et al. (2004) avaliaram os efeitos da OUA na contratilidade cardíaca e também não encontraram níveis elevados de cTnI.

### 5.7. Avaliação histológica do coração

Os ratos desafiados com DOX e tratados com OLE, OUA E DIG apresentaram lesões semelhantes entre si, havendo diferença com relação à gravidade.

Macroscopicamente, foi possível observar líquido hemorrágico na cavidade abdominal, assim como congestão no coração, pulmões, fígado e baço (figura 23). Em todas as lâminas, observou-se áreas de palidez nas miofibrilas, desorganização do tecido, fragmentação dos cardiomiócitos, vacúolos intracitoplasmáticos, edema no miocárdio, citoplasma eosinofílico e amorfo (indicando necrose), núcleos picnóticos e presença de hemácias livres (figuras 24 e 25). Os indivíduos tratados com OLE tinham maior número de lesões, dispostas de forma multifocal a coalescente, o que pode ser explicado pelos efeitos tóxicos mais pronunciados da OLE na musculatura cardíaca. Como vacúolos estavam presentes em todos os grupos avaliados, é provável que a maior parte dos danos histológicos seja em decorrência da DOX, uma vez que, de acordo com a literatura, OUA e DIG não ocasionam esse tipo de lesão.

A DOX é capaz de causar alterações macroscópicas e histológicas no coração. Pontes et al. (2010), ao tratarem ratos com DOX por seis semanas e compará-los ao grupo controle, observaram aumento do peso do órgão e dilatação das suas câmaras. Microscopicamente, relataram vacuolização citoplasmática, fibrose, necrose, variação no tamanho dos núcleos e presença de infiltrados polimorfonucleares. Shivakumar et al. (2012) submetem ratos à dose cumulativa de 8mg/kg de DOX e observaram os mesmos achados de Pontes et al. (2010), além de hemorragia interfibrilar, congestão focal e áreas de ruptura das fibras musculares. Shivakumar et al. (2012), diferentemente de Pontes et al. (2010), observaram redução do peso do coração em relação ao seu grupo controle. Banco et al. (2011) avaliaram o coração de um cão que teve morte súbita após tratamento

com DOX. Os achados foram semelhantes aos já citados, acrescidos de irregularidade entre os tamanhos dos vacúolos e edema dos cardiomiócitos.

A OLE tem efeitos diretos no tecido cardíaco. Galey et al. (1996) realizaram necropsia em gado de corte e leiteiro e em equinos criados a pasto intoxicados por OLE. Constataram hemorragia, edema, degeneração e necrose no miocárdio desses animais. Botelho (2015), ao tratar cobaias com extratos de OLE, observou vacuolização citoplasmática, hemorragia e congestão. Wu et al. (2015), ao tratarem ratos com 50 $\mu$ g/kg de OUA antes de induzir ICC por constrição aórtica, observaram aumento do peso do coração nesses animais e lesões como fibrose e hipertrofia cardíaca. Jaafar, Yahya e Humadi (2019) dividiram ratos em dois grupos e os trataram com 5 $\mu$ g/kg e 10 $\mu$ g/kg de DIG, respectivamente. Os pesquisadores demonstraram que doses baixas de DIG são capazes de causar hemorragia, edema e hialinização dos cardiomiócitos. Bourdois et al. (1986) observaram hemorragia subendocárdica em cães que receberam baixas doses de DIG.

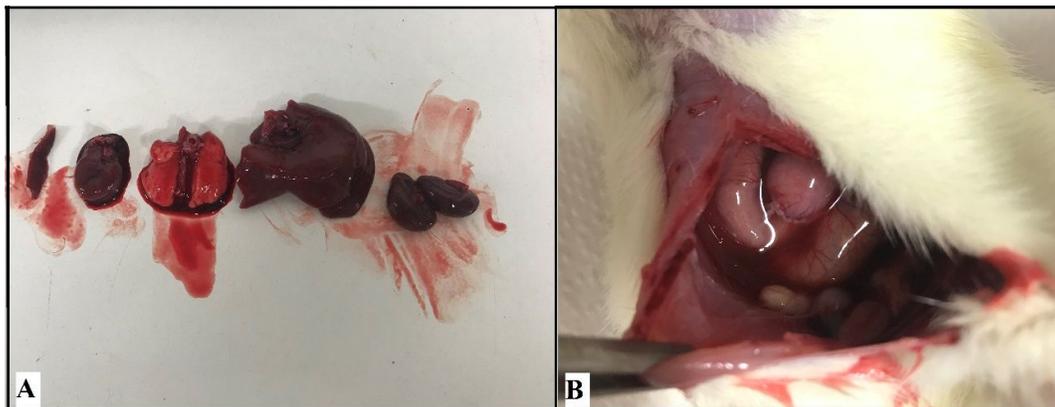


Figura 23. Alterações macroscópicas causadas em rato Wistar após desafio com doxorubicina e tratamento com digoxina.

A. Da esquerda para a direita: baço, coração, pulmões, fígado e rins apresentando congestão intensa. B. Abdômen com grande quantidade de líquido hemorrágico.

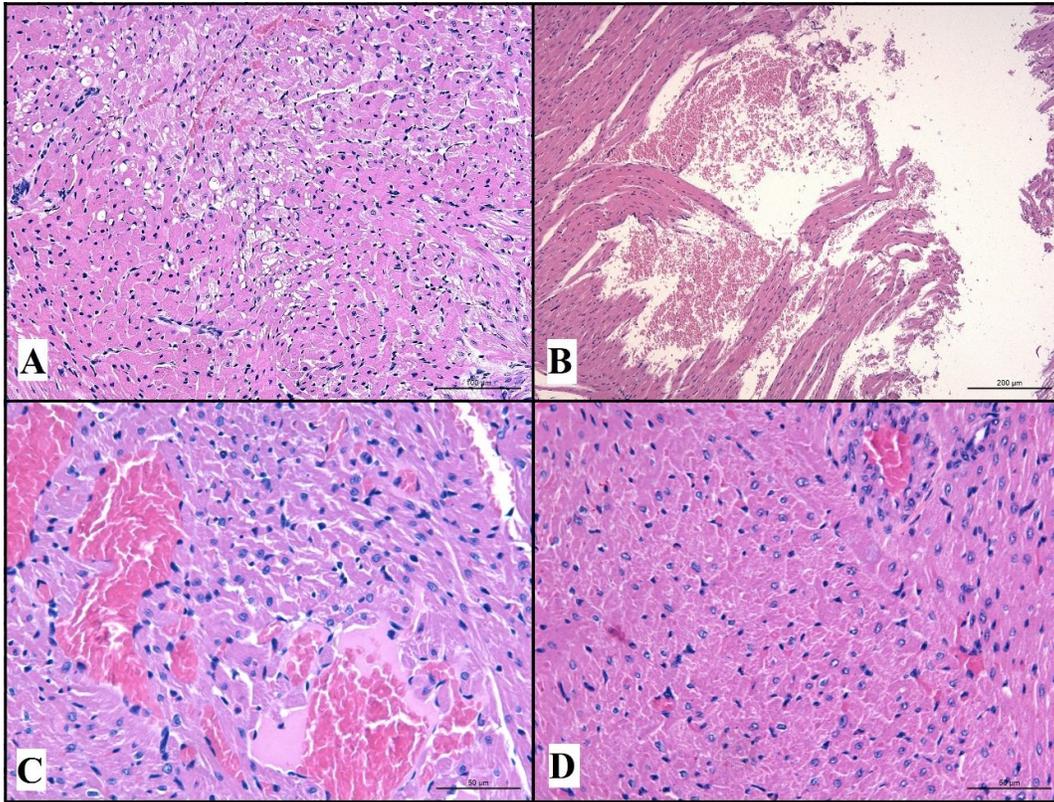


Figura 24. Cortes histológicas do coração de ratos Wistar desafiados com doxorubicina e tratados com salina e oleandrina.

A. Histologia do coração de um rato Wistar desafiado com doxorubicina e tratado com salina. Observam-se inúmeros vacúolos citoplasmáticos da eosinofilia (HE, 50x). B. Histologia do coração de um rato Wistar desafiado com doxorubicina e tratado com oleandrina. Observa-se uma área extensa de hemorragia no miocárdio (HE, 200x). C. Histologia do coração de um rato Wistar desafiado com doxorubicina e tratado com oleandrina. Observa-se citoplasma eosinofílico e presença de material amorfo, evidenciando necrose (HE, 50x). D. Histologia do coração de um rato Wistar desafiado com doxorubicina e tratado com oleandrina. Observam-se núcleos picnóticos e inúmeros vacúolos citoplasmáticos (HE, 100x).

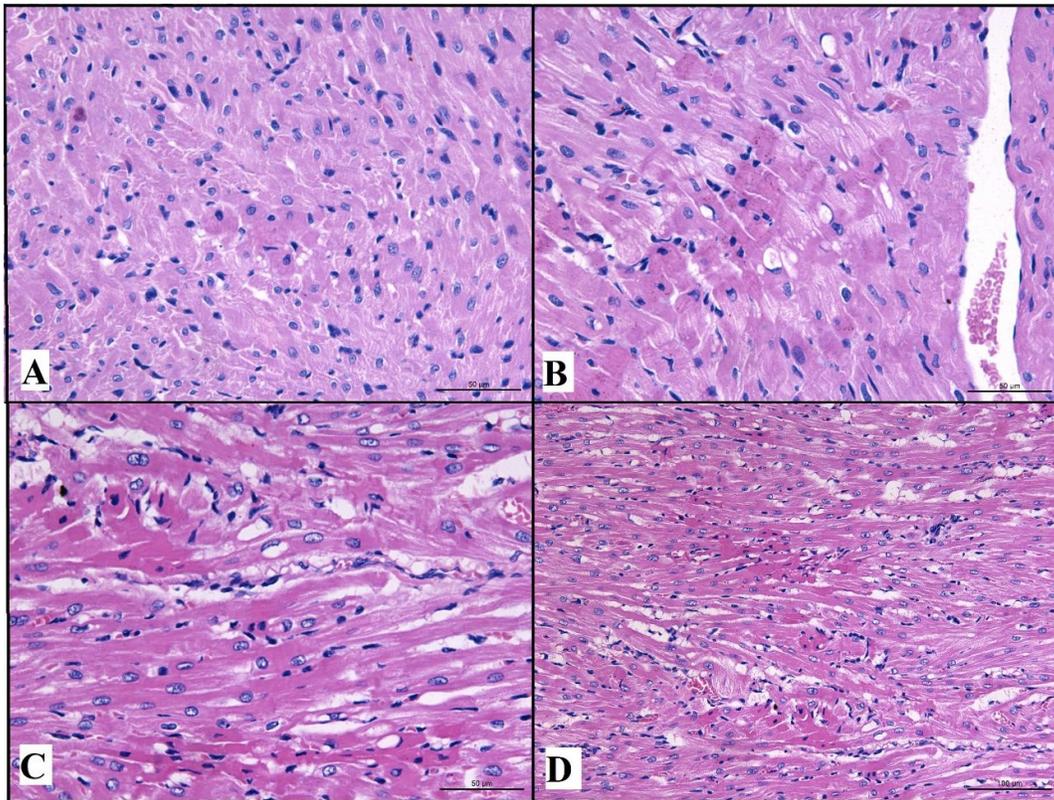


Figura 25. Cortes histológicos do coração de ratos Wistar desafiados com doxorubicina e tratados com ouabaína e digoxina.

A. Histologia do coração de um rato Wistar desafiado com doxorubicina e tratado com ouabaína. Observa-se desorganização das fibras musculares cardíacas e núcleos de diferentes tamanhos (HE, 50x). B. Histologia do coração de um rato Wistar desafiado com doxorubicina e tratado com ouabaína. Observam-se vacúolos citoplasmáticos (HE, 50x). C. Histologia do coração de um rato Wistar desafiado com doxorubicina e tratado com digoxina. Observam-se núcleos normais e núcleos picnóticos, além de vacúolos citoplasmáticos (HE, 50x). D. Histologia do coração de um rato Wistar desafiado com doxorubicina e tratado com digoxina. Observa-se intensa desorganização do tecido muscular cardíaco, núcleos picnóticos e vacúolos citoplasmáticos (HE, 100x).

## 6. CONCLUSÕES

Nas condições em que esse experimento foi realizado é possível concluir que os GCs OLE, OUA e DIG não apresentam potencial terapêutico no tratamento da ICC induzida pela DOX.

Os fármacos não foram capazes de otimizar os parâmetros avaliados na ECO, no ECG e causaram alterações deletérias nos índices hematológicos e bioquímicos dos ratos. Além disso, ocasionaram lesões necróticas ao tecido cardíaco.

Com base nos resultados, pondera-se que mais estudos são necessários para avaliar a farmacocinética e farmacodinâmica desses GCs.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, J.A. Feline hypertrophic cardiomyopathy: an update. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.40, n.4, p.685-700, 2010.

ABDOU, R.H.; BASHA, W.A.; KHALIL, W.F. Subacute toxicity of *Nerium oleander* ethanolic extract in mice. *Toxicological Research*, v.35, n.3, p.233-239, 2019.

ABERLOFF, M.D.; ARMITAGE, J.O.; NIEUDERHUBER, J.E. et al. Cardiac effects of cancer therapy. In: MELONI, D. *Clinical Oncology*. Philadelphia, EUA: Churchill Livingstone, 2004, p.1254-1296.

ADAMCOVA, M.; SKARKOVA, V.; SEIFERTOVA, J. et al. Cardiac troponins are among targets of doxorubicin-induced cardiotoxicity in hiPCS-CMs. *International Journal of Molecular Sciences*, v.20, n.11, p.1-13, 2019.

AFSAR, T.; RAZAK, S.; ALMAJWAL, A. et al. Doxorubicin-induced interactions in kidney functioning, oxidative stress, DNA damage, and renal tissue morphology; Improvement by *Acatia hydasypica* tannin-rich ethyl acetate fraction. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v.27, n.9, p.2251-2260, 2020.

AHARON, I.B.; JOSEPH, H.B.; TZABARI, M. et al. Doxorubicin-induced vascular toxicity--targeting potential pathways may reduce procoagulant activity. *Plos One*, v.8, n.9, p.1-9, 2013.

AHMED, A.; WAAGSTEIN, F.; PITT, B. et al. Effectiveness of digoxin in reducing one-year mortality in chronic heart failure in the Digitalis Investigation Group trial. *The American Journal of Cardiology*, v.103, n.1, p.82-87, 2009.

AIT MOU, Y.; BOLLENSDORFF, C.; CAZORLA, O. et al. Exploring cardiac biophysical properties. *Global Cardiology Science and Practice*, v.10, p.1-12.

AKTHAR, T. SHEIKH, N.; ABBASI, M.H. Clinical and pathological features of *Nerium oleander* extract toxicosis in Wistar rats. *BCM Research Notes*, v.7, n.947, p.1-6, 2014.

ALLWORTH, M.S.; CHURCH, D.B.; MADDISON, J.E. et al. Effect of enalapril in dogs with pacing-induced heart failure. *The American Journal of Veterinary Medicine*, v.56, n.1, p.85-94, 1995.

AMES, M.K.; ATKINS, C.E., PITT, B. The renin-angiotensin-aldosterone system and its suppression. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.33, n.2, p.363-382, 2019.

ANTER, E.; JESSUP, M.; CALLANS, D.J. Atrial fibrillation and heart failure. *Circulation*, v.119, n.18, p.2516-2525, 2009.

ATKINS, C.; BONAGURA, J.; ETTINGER, S. et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of canine chronic valvular disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.23, n.1, p.1142-1150, 2009.

ATKINS, C.E. Canine Heart Failure: Current Concepts. In: *World Small Animal Veterinary Association Congress Proceedings*, 2007.

AYLA, S.; SECKIN, I.; TANRIVERDI, G. et al. Doxorubicin induced nephrotoxicity: protective effect of nicotinamide. *International Journal of Cell Biology*, p.1-9, 2011.

BANCO, B.; GRIECO, V.; SERVIDA, F. Sudden death in a dog after doxorubicin chemotherapy. *Veterinary Pathology*, v.48, n.5, p.1035-1037, 2011.

BAUER, N.; SCHNEIDER, M.; NEU, H. et al. Endogenous digitalis' in healthy dogs and dogs suffering from dilatative cardiomyopathy and atrial fibrillation. *Tierarztl Praxis*, v.32, n.4, p.201-206, 2004.

BERNAY, F.; BLAND, J.M.; HAGGSTROM, J. et al. Efficacy of spironolactone on survival in dogs with naturally occurring mitral regurgitation caused by myxomatous mitral valve disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.24, n.2, p.331-341, 2010.

BERNSTEIN, A.; HUNT, M.D.; CRICHLEY, V. et al. Induction by ouabain of hemoglobin synthesis in cultured friend erythroleukemic cells. *Cell*, v.9, n.3, p.375-381, 1976.

BETHESDA. Doxorubicin. *Liver Tox.*, 2021. Disponível em: <livertox.nih.gov>. Acesso em 15, Janeiro, 2021.

BLAUSTEIN, M.; HAMLYN, J. Ouabain, endogenous ouabain and ouabain-like factors: The Na<sup>+</sup> pump/ouabain receptor, its linkage to NCX, and its myriad functions. *Cell Calcium*, v.86, n.1., p1-13., 2020.

BORLAUG, A.B.; PAULUS, W.J. Heart failure with preserved ejection fraction: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *European Heart Journal*, v.32, n.6, p.670-679, 2010.

BOTELHO, A.F.M.; MIRANDA, A.L.S.; FREITAS, T.G. et al. Comparative cardiotoxicity of low doses of digoxin, ouabain, and oleandrin. *Cardiovascular Toxicology*, v.20, n.6, p.539-547, 2020.

BOTELHO, A.F.M.; PIEREZAN, F.; SOTO-BLANCO, B. et al. A review of cardiac glycosides: Structure, toxicokinetics, clinical signs, diagnosis and antineoplastic potential. *Toxicon*, v.158, p.63-68, 2019.

BOTELHO, A.F.M.; JOVIANO-SANTOS, J.V.; SANTOS-MIRANDA, A. et al. Noninvasive ECG recording and QT interval correction assessment in anesthetized rats and mice. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v.39, n.6, p.409-415, 2019.

BOTELHO, Ana Flávia Machado. Efeitos dos glicosídeos cardioativos (digoxina ouabaína e oleandrina) na fisiologia cardiorrenal em ratos Wistar hígdos. 2018. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

- BOTELHO, Ana Flávia Machado. Alterações cardiovasculares induzidas pelo extrato de *Nerium Oleander*. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.
- BORGARELLI, M; BUCHANAN, J.W. Historical review, epidemiology and natural history of degenerative mitral valve disease. *Journal of Veterinary Cardiology*, v.14, n.1, p.93-101, 2012.
- BORGES, O.M.M.; ARAÚJO, S.B.; AZEVEDO, S.S. et al. Estudo clínico e de fatores de risco associados às alterações cardiovasculares em cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.36, n.11, p.1095-1100, 2016.
- BOULANGER, C.; VANHOUTTE, P.M. Oubain, Na<sup>+</sup>-free and K<sup>+</sup>-free solutions and relaxations to nitric oxide and nitrovasadilators. *General Pharmacology*, v22, n.2, p.337-340, 1991.
- BOURDOIS, P.S.; DANCLA, J.; FACCINI, J.M. et al. The sub-acute toxicology of digoxin in dogs; clinical chemistry and histopathology of heart and kidneys. *Archives of Toxicology*, v.51, p.273-283, 1986.
- BUCHANAN, J.W. Vertebral scale system to measure heart size in radiographs. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.30, n.2, p.379-393, 2000.
- BUCKALEW, V.M. Endogenous digitalis-like factors: an overview of the history. *Frontiers in Endocrinology*, v.49, n.6, p.1-9, 2015.
- CAMPBELL, J.T.; MACDONALD, P.S. Digoxin in heart failure and cardiac arrhythmias. *The Medical Journal of Australia*, v.179, n.2, p.98-102, 2003.
- CAMPLESI, A.C.; BELLODI, C.; SOCHA, J.J.M. et al. Dogs poisoned with *Nerium oleander* fresh leaves: clinical and electrocardiographic findings. *Ciência Rural*, v.57, n.6, p.1-6, 2017.
- CARVALHO, C.; SANTOS, R.X.; CARDOSO, S. et al. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Current Medicinal Chemistry*, v.16, n.25, p.3267-3285, 2009.
- CASSELS, B.K. Analysis of a maasai arrow poison. *Journal of Ethnopharmacology*, v.14, p.273-281, 1985.
- CAVALCANTE-SILVA, L.H.A.; LIMA, E.A.; CARVALHO, D.C.M. et al. Much more than a cardiotoxic steroid: modulation of inflammation by ouabain. *Frontiers in Physiology*, v.8, n.1, p.1-8, 2017.
- CECI, L.; GIROLAMI, F.; CAPUCCHIO, M.T. Outbreak of oleander (*Nerium oleander*) poisoning in dairy cattle: clinical and food safety implication. *Toxins*, v.471, n.12, p.1-11, 2020.
- CHAMBERS, D.; HUANG, C.; MATTHEWS, G. Starling's Law and cardiac dysfunction. In: *Basic Physiology for Anesthetists*. 2ª edição. Inglaterra: Cambridge, p.131-135, 2019.
- CHATTERJEE, K.; ZHANG, J.; HONBO, N. et al. Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology*, v.115, p.155-162, 2010.

- CHIARIELLO, M.; PERRONE-FILARDI, P. Pathophysiology of heart failure. *Mineral and Electrolyte Metabolism*, v.25, n.2, p.6-10, 1999.
- CHIRINOS, J.A.; CASTRELLON, A.; ZAMBRANO, J.P. Digoxin use is associated with increased platelet and endothelial cell activation in patients with nonvalvular atrial fibrillation. *Heart Rhythm*, v.2, n.5, p.525-529, 2005.
- CONE, C.D.; TONGIER, M.; CONE, C.M. DNA content of daughter nuclei from ouabain-induced nuclear divisions in central nervous system neurons. *Experimental neurology*, v.57, n.2, p.396-408, 1977.
- CONNOLLY, D.J.; CANNATA, J.; BOSWOOD, A. et al. Cardiac troponin I in cats with hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v.5, n.4, p.209-216, 2003.
- CÔTÉ, E. Feline congestive heart failure: current diagnosis and management. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.47, n.5, p.1055-1064, 2017.
- DEAVERS, S.; ROSBOROUGH, J.P.; MCCRADY, J.D. The effects of oleandrin on cardiac contractility in the normal dog. *Archives internacionales de Pharmacodynamie et de Therapie*. v.239, n.2, p.283-289, 1979.
- DEC, G.W. Digoxin remains useful in the management of chronic heart failure. *The Medical Clinics of North America*, v.87, n.2, p.317-337, 2003.
- DE FERRARI, G.M.; TAVAZZI, L. The role of arrhythmias in the progression of heart failure. *European Journal of Heart Failure*, v.1, n.1, p.35-40, 199.
- DELICCE, A.V.; MAKARYUS, A.N. Physiology, Frank Starling Law. StatPearls Publishing, 2020.
- DE PAIVA, L.S.; COSTA, K.M.; CANTO, F.B. et al. Modulation of mature B cells in mice following treatment with ouabain. *Immunobiology*, v.216, n.9, p.1038-1043, 2011.
- De VASCONCELOS, D.I.; LEITE, J.A.; CARNEIRO, L.T. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of ouabain in mice. *Mediators of Inflammation*. p.1-11, 2011.
- DEY, P. The pharmaco-toxicological conundrum of oleander: Potential role of gut microbiome. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. v.129, p.1-13, 2020.
- DHEIN, S.; MULLER, A.; KLAUS, W. Nifedipine antagonizes ouabain-induced ST-segment changes and derangement of epicardial activation pattern in isolated rabbit hearts. *International Journal of Cardiology*, v.29, n.2, p.163-172, 1990.
- DOGGRELL, S.A., BROWN, L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovascular Research*, v.39, n.1, p.89-105, 1998.

- ELSHARBINY, N.M.; EL-SHERBINY, M. Thymoquinone attenuates doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats: role of Nrf2 and NOX4. *Chemico-Biological Interactions*, v.223, n.12, p.102-108, 2014.
- ERLING, P.; MAZZAFERRO, E.M. Left-sided congestive heart failure in dogs: pathophysiology and diagnosis. *Compendium Continuing Education for Veterinarians*, v.30, n.2, p.79-91.
- ESPOSITO, A.L.; CLARK, C.A.; POIRIER, W.J. The cardiac glycoside digoxin does not alter the activity of human polymorphonuclear leukocytes in vitro. *The Journal of Infectious Diseases*, v.157, n.5, p.1084-1089, 1988.
- ESPOSITO, A.L. Digoxin disrupts the inflammatory response in experimental pneumococcal pneumonia. *The Journal of Infectious Diseases*, v.152, n.1, p.14-23, 1985.
- FERASIN, L.; STURGESS, C.P.; CANNON, M.J. et al. Feline idiopathic cardiomyopathy: a retrospective study of 106 cats (1994-2001). *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v.5, n.3, p.151-159, 2003.
- FERREIRA FILHO, P.RP. Padrões de hipertrofia e geometria do ventrículo esquerdo pela ecocardiografia transtorácica. *Revista Brasileira de Ecocardiografia – Imagem Cardiovascular*, v.25, n.2, p.103-115, 2012.
- FORMIGA, F.; ARIZA, A. Digoxin in reduced heart failure and sinus rhythm. When should it be indicated in 2018? *Revista Espanola de Geriatria y Gerontologia*, v.53, n.3, p.119-120, 2018.
- FUENTES, V.L.; ABBOTT, J.; CHETBOUL, V. et al. ACVIM Consensus statement guidelines for the classification, diagnosis and management of cardiomyopathies in cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.34, n.3, p.1062-1077, 2020.
- FUENTES, V.L. Treatment of canine heart failure. In: *World Small Animal Veterinary Association Congress Proceedings*, 2009.
- FUENTES, V.L. Use of pimobendan in the management of heart failure. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.34, n.5, p. 1145-1155, 2004.
- GALEY, F.D.; HOLSTEGE, D.M.; PLUMLEE, K.H. et al. Diagnosis of oleander poisoning in livestock. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.8, n.3, p.358-364, 1996.
- GANPISETTI, R.; CHANDLURI, P.; LAKSHMI, B.V.S. et al. Cardiac glycosides uses in heart. *World Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, v.2, n.2, p.291-299, 2016.
- GAVA, F.N.; SILVA, S.N.S.; ROSA, F.A. et al. Correlation between systolic function and presence of myofibroblasts in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Ciência Rural*, v.46, n.9, p.1642-1648, 2016.

- GEORGIADIS, N.; TSAROUHAS, K.; REZAEI, R. et al. What is considered cardiotoxicity of anthracyclines in animal studies. *Oncology Reports*, v.44, n.3, p.798-818, 2020.
- GHEORGHIADE, M.; FILIPPATOS, G.; DE LUCA, L. et al. Congestion in acute heart syndromes: an essential target of evaluation and treatment. *American Journal of Medicine*, v.119, n.12., p.3-10, 2006.
- GOMBERG-MAITLAND, M.; BARAN, D.A.; FUSTER, V. Treatment of congestive heart failure. *Journal of the American Medical Association*, v.161, n.12, 2001.
- GRAF, J.; PETERLIK, M. Ouabain-mediated sodium uptake and bile formation by isolated perfused rat liver. *American Journal of Physiology*, v.230, n.4, p.876-885.
- GREIG, D.; AUSTIN, P.C.; ZHOU, L. et al. Ischemic Electrocardiographic Abnormalities and Prognosis in Decompensated Heart Failure. *Circulation: Heart Failure*, v.7, n.6, p.986-993, 2014.
- HALLMAN, B.E.; HAUCK, M.L.; WILLIAMS, L.E. et al. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.33, n.2, p.783-791, 2019.
- HAMLYN, J.M.; MANUNTA, P. Endogenous cardiotonic steroids in kidney failure: a review and a hypothesis. *Advances in Kidney Chronic Disease*, v.22, n.3, p.232-244, 2015.
- HAMLYN, J.; BLAUSTEIN, M.P.; BOVA, S. et al. Identification and characterization of an ouabain-like compound from human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.88, n.14, p.6259-6263, 1991.
- HANAI, K.; TABAKA, K.; MANABE, S. et al. Evaluation of cardiac function by echocardiography in dogs treated with doxorubicin. *The Journal of Toxicological Sciences*, v.21, n.1, p.1-10, 1996.
- HASENFUSS, G. Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovascular Research*, v.39, n.1, p.60-76, 1998.
- HENRIKSEN, P.A. Anthracycline cardiotoxicity: an update on mechanism, monitoring and prevention. *Heart*. v.104, n.12, p.971-977, 2018.
- HIGGINS, C. Urea and creatinine concentration, the urea:creatinine ratio. *Acute Care Testing*, 2015. Disponível em: <[acutecaretesting.org](http://acutecaretesting.org)>. Acesso em 10, dezembro, 2019.
- HINDERLING, P.H. Kinetics of partitioning and binding of digoxin and its analogues in the subcompartments of blood. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.73, n.8, p.1042-1053, 1984.
- HOLMGREN, G. SYNNERGREN, J.; BOGESTAL, Y. Identification of novel biomarkers for doxorubicin-induced toxicity in human cardiomyocytes derived from pluripotent stem cells. *Toxicology*, v.328, p.102-111, 2015.
- HORI, M.; OKAMOTO, H. Heart rate as a target of treatment of chronic heart failure. *Journal of Cardiology*, v60, n.2, p.86-90, 2012.

HOU, L.; ZHOU, B.; YANG, L. et al. Inhibition of free radical initiated peroxidation of human erythrocyte ghosts by flavonols and their glycosides. *Organic & Biomolecular Chemistry*, v.2, n.9, p.1419-1423, 2004.

HRELIA, S.; FIORENTINI, D.; MARALDI, T. et al. Doxorubicin induces early lipid peroxidation associated with changes in glucose transport in cultured cardiomyocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1567, n.1-2, p.150-156, 2002.

IRIS Staging of CKD. International Renal Interest Society, 2019. Disponível em: <[http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS\\_Staging\\_of\\_CKD\\_modified\\_2019.pdf](http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS_Staging_of_CKD_modified_2019.pdf)>. Acesso em 10/12/2019.

JAAFAR, F.R.; YAHYA, N.; HUMADI, A.A. The histopathological changes of digoxin on mice vital organs. *Biochemical and Cellular Archives*, v.19, n.2, p.3147-3152, 2019.

JIANG, X.; REN, Y.; LU, Z. Ouabain induces cardiac remodeling in rats independent of blood pressure. *Cardiovascular Pharmacology*, v.28, p.344-352, 2007.

KARADENIZ, A.; AYTEKIN, I.; AKGUL, Y. Effects of acute and subacute digoxin intoxication on haematological parameters and serum CK and LDH activities in dogs. *Revue de Médecine Vétérinaire*, v.159, n.2, p.96-100, 2008.

KARAYE, K.M.; SANI, M.U. Electrocardiographic abnormalities in patients with heart failure. *Cardiovascular Journal of Africa*, v.19, n.1, p.22-25, 2008.

KEMP, C.D., CONTE, J.V. The pathophysiology of heart failure. *Cardiovascular Pathology. The Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v.21, n.5, p.365-371, 2012.

KHORDADMEHR, M.; NAZIFI, S. Study of troponin, creatine kinase biomarkers, and histopathological lesions in experimental *Nerium Oleander* toxicity in rats and mice. *Journal of Veterinary Research*, v.62, n.1, p.97-102, 2018.

KIM, E., LIM, K.; KIM, K. et al. Doxorubicin-induced platelet cytotoxicity: a new contributory factor for doxorubicin-mediated thrombocytopenia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v.7, n.7, p.1172-1183, 2009.

KIRILMAZ, B.; SAYGI, S.; GUNGOR, H. et al. Digoxin intoxication: an old enemy in modern era. *Journal of Geriatric Cardiology*. v.9, n.3, p. 237-242, 2012.

KIRKPATRICK, J.N.; VANNAN, M.A., NARULA, J. et al. Echocardiography in heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*, v.50, n.5, p.381-396, 2007.

KOEPPE, B.M.; STANTON, B.A. *Berne e Levy: Fisiologia*. 6ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

KUMAR, A.; TAMNOY, D.; MISHRA, A. et al. Oleandrin: a cardiac glycoside with potent cytotoxicity. *Pharmacognosy Review*. v.7, n.14, p.131-139, 2013.

KVART, C. Efficacy of enalapril for prevention of heart failure in dogs with myxomatous disease and asymptomatic mitral regurgitation. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.16, n.1, p.80-88, 2002.

- LANGFORD, S.D.; BOOR, P.J. Oleander toxicity: an examination of human and animal toxic exposures. *Toxicology*, v.109, n.1, p.1-13, 1996.
- LANGHORN, R.; WILLESEN, J.L. Cardiac troponins in dogs and cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.30, n.1, p.36-50, 2016
- LEE, D.C.; JOHNSON, R.A.; BINGHAM, J.B. Heart failure in outpatients: a randomized trial of digoxin versus placebo. *The New England Journal of Medicine*, v.306, n.12, p.699-705, 1982.
- LEES, A.D.; WILSON, J.; ORCHARD, C.H. et al. Ouabain enhances basal and stimulus-induced cytoplasmic calcium concentrations in platelets. *Thrombosis and Haemostasis*. v.62, n.3, p.1000-1005, 1989.
- LE GRAND, B.; DEROUBAIX, E. COULOMB, A. et al. Stimulatory effect of ouabain on T- and L-type calcium currents in guinea pig cardiac myocytes. *American Journal of Physiology*, v.258, n.5, p.1620-1623, 1990.
- LEFEBVRE, H.P.; BROWN, S.A.; CHETBOUL, V. Angiotensin-converting enzyme inhibitors in veterinary medicine. *Current Pharmaceutical Design*, v.13, n.13, p.1347-1361, 2007.
- LINDENMAYER, G.E.; SCHWARTZ, A.; THOMPSON, H.K. A kinetic description for sodium and potassium effects on (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-adenosine triphosphatase: a model for a two-nonequivalent site potassium activation and an analysis of multiequivalent site models for sodium activation. *The Journal of Physiology*, v.236, n.1, p.1-28, 1974.
- LOURENÇO, P.; RIBEIRO, A.; CUNHA, F.M. et al. Is there a heart rate paradox in acute heart failure? *Internal Journal of Cardiology*, v.203, p.409-414, 2016.
- LYU, Y.L.; KERRIGAN, J.E.; LIN, C. et al. Topoisomerase II beta mediated DNA double-strand breaks: implications is doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dezrazoxane. *Cancer Research*, v.67, n.18., p.8839-8846, 2007.
- MAACK, C. The cardiac re-AKT-ion to chronic volume overload. *European Journal of Heart Failure*, v.18, n.4, p.372-374, 2016.
- MACDONALD, K.A.; KITTLESON, M.D., MUNRO, C. et al. Brain natriuretic peptide concentration in dogs with heart disease and congestive heart failure. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.17, n.2, p.172-177, 2008.
- MACDONALD, K.A.; KITTLESON, M.D.; KASS, P.H. et al. Effect of spironolactone on diastolic function and left ventricular mass in Maine Coon cats with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.22, n.2, p.335-341, 2008.
- MACLEOD-GLOVER, N.; MINK, M.; YAREMA, M. et al. Digoxin toxicity: case for retiring its use in elderly patients? *Canadian Family Physician*. v.62, n.3, p. 223-228, 2016.

MCGILL, J.L.; GUERRA-MAUPOME, M.; SCHNEIDER, S. Prophylactic digoxin treatment reduces IL-17 production in vivo in the neonatal calf and moderates RSV-associated disease. *Plos One*, v.14, n.3, p.1-20, 2017.

MALIK, A.; MASSON, R.; SINGH, S. et al. Digoxin discontinuation and outcomes in patients with heart failure with reduced ejection fraction. *Journal of the American College of Cardiology*, v.74, n.5, p.617-627, 2019.

MANGINI, F.; PIRES, P.P.; BRAGA, F.G.M.; BACAL, F. Decompensated heart failure. *Einstein*, v.11, n.3, p.383-391, 2013.

MANUNTA, P.; MESSAGGIO, E.; CASAMASSIMA, N. et al. Endogenous ouabain in renal Na<sup>+</sup> handling and related diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1802, n.12, p.1214-1218, 2010.

MANUNTA, P.; FERRANDI, M.; BIANCHI, G. et al. Endogenous ouabain in cardiovascular function and disease. *Journal of Hypertension*, v.27, n.1, p.9-18, 2009.

MARCHAND, D.J.; RENTON, K.W. Depression of cytochrome P-450-dependent drug biotransformation by adriamycin. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.229, n.1, p.299-304, 1984.

MARCHANDISE, B.; SCHROEDER, E.; BOSLY, A. et al. Early detection of doxorubicin cardiotoxicity: interest of Doppler echocardiographic analysis of left ventricular filling dynamics. *American Heart Journal*, v.118, n.1, p.92-98, 1989.

MARKIEWICZ, W. ROBINSON, E.; PELED, B. et al. Early detection of doxorubicin cardiotoxicity by M-mode echocardiography. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v.5, n.2, p.119-125, 1980.

MARIK, P.E.; FROMM, L. A case series of hospitalized patients with elevated digoxin levels. *The American Journal of Medicine*, v.105, n.2, p.110-115, 1998.

MATHEW, T.; WILLIAMS, L.; NAVARATNAM, G. et al. Diagnosis and assessment of dilated cardiomyopathy: a guideline protocol from the British Society of Echocardiography. *Echo Research and Practice*, v.4, n.2, p.1-13, 2017.

MEDENICA, R.; HATAM, K.; HATAM, V. et al. Digitoxin-induced thrombocytopenia. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, v.43, n.1, p.1-8, 1972.

MELERO, C.P.; MEDARDE, M; SAN FELICIANO, A. A short review on cardiotonic steroids and their aminoguanidine analogues. *Molecules*, v.5, n.1, p.51-81, 2000.

MENEZES-FILHO, J.E.R.; SOUZA, D.S.; SANTOS-MIRANDA, A. et al. Nerol attenuates ouabain-induced arrhythmias. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v.2019, p.1-9, 2019.

MOSELEY, A.E.; COUGNON, M.H.; GRUPP, I.L. et al. Attenuation of cardiac contractility in Na,K-ATPase alpha1 isoform-deficient hearts under reduced calcium conditions. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v.37, n.5, p.913-919, 2004.

MUIR, W.W.; HAMLIN, R.L. Myocardial contractility: historical and contemporary considerations. v.11, n.222, p.1-9, 2020.

MURKOFISKY, R.L.; DANGAS, G.; DIAMOND, J.A. et al. A prolonged QRS duration on surface electrocardiogram is a specific indicator of left ventricular dysfunction [see comment]. *Journal of The American College of Cardiology*, v.32, n.2, p.476-482, 1998.

NAGAI, K.; FUKUNO, S.; OTANI, K. et al. Prevention of doxorubicin-induced renal toxicity by theanine in rats. *Pharmacology*, v.101, n.3-3, p.219-224, 2018.

NELSON, O'L. Principles for therapy in the congestive heart failure. In: NELSON, O'L. *Small Animal Cardiology*. EUA: Butterworth Heinemann, 2003, p.57-72.

NERBONNE, J.M.; KASS, R.S. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiological Reviews*, v.85, n.4, p.1205-1253, 2005.

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

NEVES, C.H.; TIBANA, R.A.; PRESTES, J. et al. Digoxin induces cardiac hypertrophy without negative effects on cardiac function and physical performance in trained normotensive rats. *International Journal of Sports Medicine*, v.38, n.4, p.263-269, 2017.

NISHIMURA, T.; YOSHIDA, Y.; WATANABE, F. Blood level of mitochondrial aspartate aminotransferase as an indicator of the extent of ischemic necrosis at the rat liver. *Hepatology*. v.6, n.4, p.701-707, 1986.

O'CONNELL, J.L.; ROMANO, M.M.D; PULICI, E.C.C. et al. Short-term and long-term models of doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats: a comparison of functional and histopathological changes. *Experimental and Toxicologic Pathology*, v.69, n.4, p.213-219, 2017.

O'KEEFE, D.; SCHAEFFER, D.J. Hematologic toxicosis associated with doxorubicin administration in cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.6, n.5, p.276-282, 1993.

OLIVEIRA, Maira Souza de. Utilização de flavonóides e células-tronco no tratamento da cardiotoxicidade induzida por doxorubicina. 2013. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

OYAMA, M.A. Using cardiac biomarkers in veterinary practice. *Clinics in Laboratory Medicine*, v.35, n.3, p.555-566, 2015.

- OYAMA, M.A.; FOX, P.R.; RUSH, J.E. et al. Clinical utility of serum N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration for identifying cardiac disease in dogs and assessing disease severity. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.232, n.10, p.1496-1503, 2008.
- PACKER, M.; COATS, A.J.S.; FOWLER, M.B. et al. Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. *New England Journal of Medicine*, v.344, n.1, p.1651-1658, 2001.
- PARK, K.C.; GAZE, D.C.; COLLINSON, P.O. et al. Cardiac troponins: from myocardial infarction to chronic disease. *Cardiovascular Research*. v113, n.14, p.1708-1718, 2017.
- PASTORI, D.; CARNEVALE, R.; NOCELLA, C. Digoxin and platelet activation in patients with atrial fibrillation: *in vivo* and *in vitro* study. *Journal of the American Heart Association*, v.7, n.22, p.1-10, 2018.
- PEDROZA, H.P.; FERREIRA, M.G.; CARVALHO, J.G. et al. Concentrações de oleandrina nas folhas de *Nerium oleander* de diferentes cores de floração. *Ciência Rural*, v.45, n. 5, p. 864-866, 2014.
- PEREZ, S.; MACHADO, J.; CORDEIRO, S. Inhibition by the anti-mitotic drug doxorubicin of platelet-activating-factor-induced late eosinophil accumulation in rats. *European Journal of Pharmacology*, v.356, n.2-3, p.239-243, 1988.
- PICK, A. Digitalis and the electrocardiogram. *Circulation*, v.15, p.603-608, 1957.
- PIERDOMENICO, S.D.; BUCCI, A.; MANUNTA, P. et al. Endogenous ouabain and hemodynamic and left ventricular geometric patterns in essential hypertension. *American Journal of Hypertension*, v.14, n.1, p.44-50, 2001.
- PINCUS, M. Management of digoxin toxicity. *Australian Prescriber*, v.39, n.1, p.18-20, 2016.
- PLANA, J.C.; GALDERISI, M.; BARAC, A. Expert consensus for multimodality imaging evaluation of adult patients during and after cancer therapy: a report from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *European Heart Journal – Cardiovascular Imaging*, v.14, p.1063-1093, 2014.
- POLEGATO, B.F.; MINICUCCI, M.F.; AZEVEDO, P.S. et al. Acute doxorubicin-induced cardiotoxicity is associated with matrix metalloproteinase-2 alterations in rats. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v.35, n.5, p.1924-1933, 2015.

POLEGATO, Bertha Furlan. Mecanismos envolvidos na cardiotoxicidade aguda induzida pela doxorubicina em ratos. 2011. 62 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2011.

POLENA, S.; SHIKARA, M.; NAIK, S. et al. Troponin I as a marker of doxorubicin induced cardiotoxicity. *Proceeding of the Western Pharmacology Society*, v.48, p.142-144, 2005.

PONIKOWSKI, P.; VOORS, A.A.; ANKER, S. et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *European Heart Journal*, v.37, n.27, p.2129-2200, 2016.

PONTES, J.C.D.V.; GOMES JR, J.F.; SILVA, G.V.R. et al. Estudo anatomopatológico da miocardiopatia induzida pela doxorubicina em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.25, n.2, p.137-143, 2010.

POST, R.L.; MERRITT, C.R.; KINGSOLVING, C.R. et al. Membrane adenosine triphosphatase as a participant in the active transport of sodium and potassium in the human erythrocyte. *The Journal of Biological Chemistry*. v.235, n.6, p.1796-1802, 1960.

PRASSAS, I.; DIAMANDINS, E.P. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. *Nature reviews: Drug Discovery*, v.7, n.11, p.926-935, 2008.

PRODOUZ, K.N.; POINDEXTER, P.J.; FRATANTONI, J.C. Ouabain affects platelet reactivity as measured in vitro. *Thrombosis Research*, v.46, n.2, p.337-346, 1987.

PUGAZHENDHI, A.; EDISON, T.N.J.I.; VELMURUGAN, B.K. et al. Toxicity of doxorubicin (dox) to different experimental organ systems. *Life Sciences*, v.200, p.26-30, 2018.

RANGEL, M.M.M.; COGLIATI, B.; UBUKATA, R. Aspectos gerais sobre os principais antineoplásicos utilizados na clínica veterinária de cães e gatos: revisão de literatura. *Clínica Veterinária*, n.81, p.38-52, 2009.

REIMAN, R.A.; MAULDIN, G.E.; MAULDIN, G.N. A comparison of toxicity of two dosing schemes for doxorubicin in the cat. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v.10, n.4, p.324-331, 2008.

RELFORD, R.; ROBERTSON, J.; CLEMENTS, C. Symmetric dimethylarginine: improving the diagnosis and staging of chronic kidney disease in small animals. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. v.46, n.6, p.941-960, 2016.

REN, Y.; HUANG, R.; LU, Z. Ouabain at pathological concentrations might induce damage in human vascular endothelial cells. *Acta Pharmacologic Sinica*, v.27, n.2, p.165-172. 2006.

REZAKHANI, A.; MAHAN, M. Oleander poisoning in cattle on the Fas province. *Iran. Vet. Human Toxicology*, v.34, p.549, 1992.

RICHARDSON, D.S.; JOHNSON, S.A. Anthracyclines in haematology: preclinical studies, toxicity and delivery systems. *Blood Reviews*, v.11, n.4, p.201-223, 1997.

RIESEN, S.C.; KOVACEVIC, A.; LOMBARD, C.W. et al. Prevalence of heart disease in symptomatic cats: an overview from 1998 to 2005. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, v.149, n.2, p.65-71, 2007.

RODRIGUES-MASCARENHAS, S.; ECHEVARRIA-LIMA, J.; SANTOS, N.F. et al. CD69 expression induced by thapsigargin, phorbol ester and ouabain on thymocytes is dependent on external  $Ca^{2+}$  entry. *Life Sciences*, v.73, n.8, p.1037-1051, 2003.

ROEVENS, P.; COURCELLES, D.C. Ouabain increases the calcium concentration in intracellular stores involved in stimulus-response coupling in human platelets. *Circulation Research*, v.67, n.6, 1494-1502, 1990.

ROSEN, M.R.; GELBAND, H.; HOFFMAN, B.F. Effects of phentolamine on electrophysiologic properties of isolated canine purkinje fibers. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. v.179, n.3, p.586-593, 1972.

RUCH, S.R.; NISHIO, M.; WASSERSTROM, J.A. Effect of Cardiac Glycosides on Action Potential Characteristics and Contractility in Cat Ventricular Myocytes: Role of Calcium Overload. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.307, n.1, p.419-428, 2003.

RUSH, J. Chronic valvular heart disease in dogs. Proceedings from: 26th Annual Waltham Diets/OSU Symposium for the Treatment of Small Animal Cardiology, October, 19-20, 2002.

SANTILLI, R. *Eletrocardiografia do cão e do gato*. 2ª Edição. São Paulo: Medvet, 2020.

SAUNDERS, A.B.; GORDON, S.G. 6 practical tips from cardiologists: heart failure in dogs. *Today's Veterinary Practice*, v.5, n.4, p.24-29, 2015.

SAYER, G.; BHAT, G. The renin-angiotensin-aldosterone system and heart failure. *Cardiology Clinics*, v.31, n.1, p.21-32, 2014

SCHNEIDER, R.; WRAY, V.; NIMITZ, M. Bovine adrenals contain, in addition to ouabain, a second inhibitor of the sodium pump. *The Journal of Biological Chemistry*, v.273, n.2, p.784-792, 1998.

SCHOBBER, K.E., HART, T.M.; STERN, J.A. et al. Detection of congestive heart failure in dogs by doppler echocardiography. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.24, n.6, p.1365-1368, 2010.

SCHONFELD, W.; WEILAND, J.; LINDIG, C. et al. The lead structure in cardiac glycoside is 5 beta, 14 beta-androstane-3 beta 14-diol. *Naunyn-Schimiedeberg's Archives of Pharmacology*, v.329, n.4, p.414-426, 1958.

SCHOTOLA, H.; SOSSALLA, S.T.; RENNER, A. et al. The contractile adaption to pre-load depends on the amount of after-load. *Heart Failure Association of the European Society of Cardiology*, v.4, n.4, p.468-478, 2017.

SHAH, A.; GANDHI, D.; SRIVASTAVA, S. et al. Heart failure: a class review of pharmacotherapy. *Pharmacy and Therapeutics*, v.47, n.7, p.464-472, 2017.

- SHARMA, S.; JACKSON, P.G.; MAKAN, J. *Cardiac troponins. Journal of Clinical Pathology*, v.57, n.10, p.1025-1026, 2004.
- SHINOHARA, K.; TANAKA, K.R. The effects of adriamycin (doxorubicin HCl) on human red blood cells. *Hemoglobin*, v.4, n.5, p.735-745, 1980.
- SHIVAKUMAR, P.; RANI, M.U.; REDDY, A.G. et al. A Study on the toxic effects of doxorubicin on the histology of certain organs. *Toxicology International*, v.19, n.3, p.241-244, 2012.
- SILVA, C.E.V; CAMACHO, A.A. Alterações ecocardiográficas em cães sob tratamento prolongado com doxorubicina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, V.57, n.3, p.300-306, 2005.
- SIMONINI, M. POZZOLI, S.; BIGNAMI, E. et al. Endogenous ouabain: an old cardiotoxic steroid as a new biomarker of heart failure and a predictor of mortality after cardiac surgery. *Biomed Research International*, p.1-10, 2015.
- SINESCU, C.; AXENTE, L. Heart failure – concepts and significance: birth of prognostic model. *Journal of Medicine and Life*, v.3, n.4, p.421-429, 2010.
- SINGH, S.A. Congestive heart failure and arrhythmias: therapeutic modalities. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, v.8, n.1, p.89-97, 1997.
- SISSON, D.D. Neuroendocrine evaluation of cardiac disease. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.34, n.5, p.1105-1126, 2004.
- SMALL, A.; MCELROY, W.C.; IDE, R.S. Studies of the electrocardiogram and the toxicity of cardiac glycosides in animals exposed to hyperbaric helium. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.20, n.1, p.44-56, 1971.
- SMITH, P.A.; ALDRIDGE, B.M.; KITTLESON, M.D. Oleander toxicosis in a donkey. *Journal of Veterinary Internal Medicine: Case Report*, v.17, p.111-114, 2003.
- SMITH, T.W.; WAGNER, H.; MARKIS, J.E. et al. Studies on the localization of the cardiac glycoside receptor. *The Journal of Clinical Investigation*, v.51, p.1777-1789, 1972.
- SPERANZA, L.; PESCE, M.; FRANCESCHELLI, S. et al. The biological evaluation of ADMA/SDMA and eNOS in patients with ACHF. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, v.5, p.551-557, 2013.
- STEIN, A. VOIGT, W.; JORDAN, K. Chemotherapy-induced diarrhea: pathophysiology, frequency and guideline-based management. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, v.2, n.1, p.51-63, 2010.
- STEMMER, P.; TAI AKERA. Sodium-pump activity and its inhibition by extracellular calcium in cardiac myocytes of guinea pigs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v.940, n.2, p.188-196, 1988.

- STROBACH, H.; WIRTH, K.E.; ROJASTHAPORA, K. Absorption, metabolism and elimination of strophanthus glycosides in man. *Namyn-Schiedeberg's Arch. Pharmacol.*, v.334, p.496-500, 1986.
- SU, Z.; YE, J.; QIN, Z. et al. Protective effects of madecassoside against doxorubicin induced nephrotoxicity *in vivo* and *in vitro*. *Nature: Scientific Reports*, n.5, p.1-5, 2015.
- TAHERI, S.; SOLATI, A.; MORADI, P. et al. Toxic effects of *Nerium oleander* aqueous leaf extract on haematological parameters and histopathological changes of the lungs and heart in rabbits. *Comparative Clinical Pathology*, v.22, n.6, p.1-5, 2012.
- TESTANI, J.M.; BRISCO, M.A.; TANG, W.H.H. et al. Potential effects of digoxin on long term renal and clinical outcomes in chronic heart failure. *Journal of Cardiac Failure*. v.19, n.5, p.295-302, 2013.
- THARWAT, M.; AL-SOBAYIL, F. Influence of the cardiac glycoside digoxin on cardiac troponin I, acid-base and electrolyte balance, and haematobiochemical profiles in healthy donkeys (*Equus asinus*). *BMC Veterinary Research*, v.10, n.64, p.1-6, 2014.
- THRALL, M.A. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. 2ª Edição. São Paulo: Roca, 2015.
- VAN BOXTEL, C.J.; KOOPMANS, R.; OOSTERHUIS, B. et al. Red blood cell electrolytes for monitoring digoxin therapy in adults. *Therapeutic Drug Monitoring*, v.7, n.2, p.191-196, 1985.
- VILLANI, F.; MONTI, E.; PICCININI, F. et al. Relationship between Doxorubicin-Induced ECG changes and myocardial alterations in rats. *Tumori Journal*, v.72, n.3, p.323-329, 1986.
- VINCENT, J. Understanding cardiac output. *Critical Care*. v.12, n.4, p.1-3.
- WALLICK, D.W.; VALENCIC, F.; FRATIANNI, R.B.; LEVY, M.N. Effects of ouabain and vagal stimulation on heart rate in dog. *Cardiovascular Research*, v.18, n.2, p.75-79, 1984.
- WEBER, K.T. Aldosterone in congestive heart failure. *New England Journal of Medicine*, v.345, n.1, p.1689-1697, 2001.
- WHAYNE JR, T.F. Clinical use of digitalis: a state of art review. *American Journal of Cardiovascular Drugs*, v.18, n.2, p.427-440, 2018.
- WIJAYASIRI, L.; RHODES, A.; CECCONI, M. Cardiac contractility. In: VINCENT, J.; HALL, J.B. *Encyclopedia of Intensive Care Medicine*. Berlin:Springer, 2012, p.30-45.

- WOODBURY, L.A.; HECHT, H.H. Effects of cardiac glycosides upon the electrical activity of single ventricular fibers of the frog heart, and their relation to the digitalis effect of the electrocardiogram. *Circulation*, v.6, n.2, p.172-182, 1952.
- WU, J.; LI, D.; DU, L. et al. Ouabain prevents pathological cardiac hypertrophy and heart failure through activation of phosphoinositide 3-kinase  $\alpha$  in mouse. *Cell & Bioscience*, v.64, n.5, p.1-15, 2015.
- YEH, E.T.; BICKFORD, C.L. Cardiovascular complications of cancer therapy: incidence, pathogenesis, diagnosis and management. *Journal of the American College of Cardiology*, v.54, n.24, p.2231-2247, 2009.
- YEMM, K.E.; ALWAN, L.M.; MALIK, A.B. et al. Renal toxicity with liposomal doxorubicin in metastatic breast cancer. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, v.25, n.7, p.1738-1742, 2019.
- YOUNG, R.C.; NACHMAN, R.L.; HOROWITZ, H.I. Thrombocytopenia due to digoxin. *The American Journal of Medicine*, v.41, n.4, p.605-614, 1966
- ZAMORANO, J.L.; LANCELLOTTI, P.; MUNOZ, D.R. et al. The task force for cancer treatments and cardiovascular toxicity of the European Society of Cardiology. *European Heart Journal*. v.37, n.36, p.2768-2801, 2016.
- ZHOU, C.; YU, F.; ZENG, P. et al. Circadian sensitivity to the cardiac glycoside oleandrin is associated with diurnal intestinal P-glycoprotein expression. *Biochemical Pharmacology*, v.169, p.1-9, 2019.
- ZHOU, J.; CAO, J.; JIN, W. et al. Digoxin is associated with worse outcomes in patients with heart failure with reduced ejection fraction. *Heart Failure*, v.7, n.1, p.139-147, 2020.

**ANEXO**  
**Certificado do CEUA**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**CEUA**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

**Protocolo CEUA:** 74/2017

**Título do projeto:** Efeitos dos glicosídeos cardioativos no remodelamento eletromecânico do coração

**Finalidade:** Pesquisa

**Pesquisador responsável:** Marília Martins Melo

**Unidade:** Escola de Veterinária

**Departamento:** Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária

**Situação atual:** Decisão Final - Aprovado

Aprovado na reunião do dia 05/06/2017. Validade: 05/06/2017 à 04/06/2022  
Belo Horizonte, 05/06/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

---