

**ANA CATARINA VEIGA CARVALHO**

**AVALIAÇÃO DA CARDIOTOXICIDADE DA  
DOXORRUBICINA EM CÃES –  
ESTUDO PILOTO**

**Orientador:** Prof. Doutor Luís Lima Lobo

**Co-orientador:** Doutor Joaquim Henriques

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias**

**Faculdade de Medicina Veterinária**

**Lisboa**

**2017**

**ANA CATARINA VEIGA CARVALHO**

**AVALIAÇÃO DA CARDIOTOXICIDADE DA  
DOXORRUBICINA EM CÃES –  
ESTUDO PILOTO**

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

**Presidente:** Prof. Doutora Laurentina Pedroso

**Arguente:** Prof. Doutor Hugo Gregório

**Orientador:** Prof. Doutor Luís lima lobo

**Vogal:** Prof. Doutor João Requicha

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias**

**Faculdade de Medicina Veterinária**

**Lisboa**

**2017**

Dedico este trabalho, que representa o culminar do meu percurso académico, aos meus avós, Alice e Manuel.

Obrigada por me terem dado o melhor de vós.

## Agradecimentos

Agradeço à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Humanidades e Tecnologias, e em especial à Professora Doutora Laurentina Pedroso.

Agradeço ao meu Orientador, Doutor Luís Lima Lobo, pela sua disponibilidade e empenho na realização deste trabalho, ajudando-me a ultrapassar todos os obstáculos encontrados, sempre com um grande otimismo e simpatia.

Agradeço ao Doutor Joaquim Henriques, meu Co-orientador, pela constante partilha de conhecimentos, por toda a ajuda e conselhos, sempre com a sua simpatia e boa disposição tão características. Agradeço, especialmente, por me ter mostrado que a oncologia consegue ser uma medicina bastante gratificante.

A toda a equipa de médicos, enfermeiras, auxiliares e estagiários do Hospital Veterinário Berna, deixo o meu mais sincero obrigada, por me terem recebido tão bem e me terem ajudado a evoluir de dia para dia, como pessoa e como futura médica veterinária, e por toda a colaboração neste estudo. Deixo um particular agradecimento à Dra. Inês Fonseca, por toda a ajuda, disponibilidade e dedicação na realização da componente prática deste trabalho.

Agradeço a todos os professores, que me transmitiram o seu conhecimento, incentivando-me a ser melhor e ajudando-me a ultrapassar todas as dificuldades.

Agradeço ao Professor Mauro Bragança, por toda a dedicação e esforço na realização da componente estatística deste trabalho.

Agradeço à Marta e à Sara, companheiras de curso e de aventuras, que, de uma forma otimista e descontraída, me ajudaram a vencer todas as batalhas e a saborear todas as conquistas. Agradeço também à Rita, à Teresa, ao Moreira e ao Chico, por terem partilhado comigo os melhores anos da minha vida estudantil.

Agradeço à minha família, aos meus amigos e a todos aqueles que me incentivaram e apoiaram durante todo este percurso. Um especial obrigada aos meus pais, pela oportunidade de realização deste sonho de infância, por todos os gastos financeiros e emocionais, toda a dedicação e carinho que tiveram. À minha irmã e ao Luís, dois grandes pilares na minha vida, agradeço sinceramente por tudo! Foi, especialmente, graças a vocês que eu cheguei aqui. Obrigada por toda a paciência, todos os conselhos e todo o apoio incondicional.

Agradeço ao meu namorado, João, por ter sempre acreditado em mim e me mostrar que a determinação e o esforço são a chave para o sucesso. Obrigada por poder encontrar sempre o teu sorriso e o teu abraço nos momentos difíceis e por poder celebrar contigo todas as pequenas vitórias. Obrigada por fazeres de mim uma pessoa mais feliz!

## Resumo

A doxorubicina, é um potente agente antineoplásico, pertencente a uma das principais classes de quimioterápicos utilizadas em oncologia, as antraciclinas. Este fármaco apresenta atividade antitumoral contra uma grande variedade de neoplasias, tais como, linfoma, sarcomas e carcinomas, no entanto, o seu uso é condicionado pela possível ocorrência de cardiotoxicidade.

O mecanismo cardiotoxico da doxorubicina ainda é controverso, no entanto, pensa-se que está relacionado com um aumento do stress oxidativo no miocárdio, devido, sobretudo, à formação de espécies reativas de oxigénio e indução de peroxidação lipídica nas células cardíacas. A cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina manifesta-se de forma semelhante à cardiomiopatia dilatada, num processo que depende da dose total cumulativa administrada.

Neste estudo, pretendi avaliar a presença de cardiotoxicidade em cães com diferentes neoplasias, sujeitos a quimioterapia com doxorubicina. Para o efeito, foram realizados controlos de parâmetros ecocardiográficos e de biomarcadores cardíacos, durante 5 estádios de administração de doxorubicina.

Os resultados do estudo não foram sugestivos de ocorrência de cardiotoxicidade, porém, um aumento da concentração de troponina I, com maior relevância no final do protocolo, pareceu sugerir alguma contribuição da doxorubicina na lesão do miocárdio.

Devido ao constrangimento associado às perdas de seguimento, frequentemente implícitas na especialidade oncológica, não foi possível obter um tamanho de amostra ideal, pelo que as conclusões retiradas deste estudo são limitativas.

Pretende-se, com este estudo, alertar para a importância de uma prevenção e controlo frequentes da função cardíaca em animais tratados com este fármaco cardiotoxico. Apesar de a cardiotoxicidade não ser tão frequente em cães, devido a uma menor agressividade dos protocolos quimioterápicos e a um maior controlo das doses cumulativas utilizadas, creio que é fundamental apostar na prevenção, de forma a assegurar um diagnóstico precoce de cardiotoxicidade, ou até mesmo, de patologias cardíacas ocultas ou envolvimento cardíaco de origem neoplásica, os quais, podem contribuir para um agravamento da saúde de cada paciente.

**Palavras-Chave:** Doxorubicina, cardiotoxicidade, cães, ecocardiografia, biomarcadores cardíacos

## **Abstract**

Doxorubicin is a potent antineoplastic agent, belonging to one of the major classes of chemotherapeutic drugs used in oncology, the anthracyclines. Doxorubicin exerts antitumor activity against a wide variety of neoplasms, such as lymphoma, sarcomas and carcinomas, however, its use is conditioned by the possible occurrence of cardiotoxicity.

The cardiotoxic mechanism of doxorubicin is still controversial, however, it is thought to be related to an increase in oxidative stress in the myocardium, mainly due to the generation of reactive oxygen species and lipid peroxidation, in cardiac cells. The cardiotoxicity induced by doxorubicin manifests itself in a similar way to dilated cardiomyopathy, in a process that depends on the cumulative total dosage administered.

In this study, I intended to evaluate the presence of cardiotoxicity in dogs with different neoplasms, undergoing doxorubicin chemotherapy protocols. For this purpose, controls of echocardiographic parameters and cardiac biomarkers were performed during 5 stages of doxorubicin administration.

Results of this study were not suggestive of cardiotoxicity, however, a consistent increase in plasma cardiac troponin I, with greater relevance at the end of the protocol, suggested some contribution of doxorubicin in myocardial injury. Because of the constraint associated with loss to follow-up, often implied in medical oncology, it was not possible to obtain an ideal sample size, so the conclusions drawn from this study are limiting.

With this study, I pretend to alert to the importance of frequent prevention and control of cardiac function, in animals treated with this cardiotoxic drug. Although cardiotoxicity is not so frequent in dogs, due to the lower aggressiveness of chemotherapy protocols and a greater control of the cumulative doses, I believe that it is fundamental to focus on prevention in order to ensure an early diagnosis of cardiotoxicity, or even occult cardiac pathologies or cardiac involvement of neoplastic origin, which can contribute to a worsening of the health of each patient.

**Keywords:** Doxorubicin, cardiotoxicity, dogs, echocardiography, cardiac biomarkers

## Lista de Abreviaturas e símbolos

- 2DSE – Two-dimensional strain echocardiography
- ADN – Ácido Desoxirribonucleico
- AE/Ao – Rácio do átrio esquerdo pela aorta
- ALT – Alanina aminotransferase
- ANP – Péptido natriurético atrial (do inglês, atrial natriuretic peptide)
- ARN – Ácido ribonucleico
- ASC – Área de superfície corporal
- ASE – American Society of Echocardiography
- ATP – Adenosina Trifosfato (do inglês, adenosine triphosphate)
- AUC – Área sob a Curva (do inglês, area under curve)
- BNP – Péptido natriurético cerebral (do inglês, brain natriuretic peptide)
- CAMV – Centro de atendimento médico veterinário
- CHOP – Ciclofosfamida, Doxorrubicina, Vincristina, Prednisona
- CMD – Cardiomiopatia dilatada
- COP – Ciclofosfamida, Vincristina, Prednisona
- cPLI - Teste de imunoreatividade da lipase pancreática específica canina
- CPR – Enzima NADPH Citocromo p450 redutase
- CTE – Cadeia transportadora de elétrons
- cTnC – Troponina cardíaca C
- cTnI – Troponina cardíaca I
- cTnT – Troponina cardíaca T
- DOX – Doxorrubicina
- DMT – Dose Máxima Tolerada
- DMVM – Doença Mixomatosa da Válvula Mitral
- DVEs – Diâmetro interno do ventrículo esquerdo em sístole
- DVEd – Diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole
- ECG – Eletrocardiograma
- eNOS – Isoforma endotelial da enzima sintase do óxido nítrico
- ERO – Espécies reativas de oxigênio
- ET-1 – Endotelina-1
- FDA – Food and Drug Administration

E/A – Rácio da onda E pela onda A do fluxo transmitral  
FE – Fração de ejeção  
FS – Fração de encurtamento  
GRT – Gradiente de pressão de regurgitação da válvula tricúspide  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogénio  
HP – Hipertensão Pulmonar  
ICC – Insuficiência cardíaca congestiva  
IGF-1 – Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (do inglês, insulin-like growth factor I)  
IP – Intraperitoneal  
IV – Intravenoso  
IVVEd – Índice do Volume do Ventrículo Esquerdo em telediástole  
IVVEs – Índice do Volume do Ventrículo Esquerdo em telesístole  
Kg – Quilograma  
m<sup>2</sup> – Metro quadrado  
mg – Miligrama  
mL – Mililitro  
mRNA – ARN mensageiro  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> – anião superóxido  
PAP – Pressão da artéria pulmonar  
PMI – Ponto de Máxima Intensidade  
Redox – Reações de oxidação-redução  
RS – Retículo sarcoplasmático  
SERCA – Bomba de cálcio do retículo endoplasmático (Sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> activated ATPase)  
TMS – Tempo Médio de Sobrevivência  
VAC – Vincristina, Doxorrubicina, Ciclofosfamida  
VRT – Velocidade do fluxo regurgitante da válvula tricúspide  
XO – Enzima Xantina oxidase

# Índice Geral

Dedicatória.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Agradecimentos.....	4
Resumo.....	5
Abstract.....	6
Lista de Abreviaturas e símbolos.....	7
Índice Geral.....	9
Índice de tabelas.....	12
Índice de figuras.....	12
Índice de gráficos.....	13
Introdução.....	14
I. Descrição do estágio curricular.....	14
II. Revisão Bibliográfica.....	17
1.1. Quimioterapia em Medicina Veterinária.....	17
1.2. Terapia Combinada Vs Monoterapia.....	18
1.3. Toxicidade causada por quimioterápicos.....	19
1.4. Classes de quimioterápicos.....	22
1.4.1. Agentes Alquilantes.....	23
1.4.2. Antimetabolitos.....	23
1.4.3. Agentes Antimicrotubulos.....	23
1.4.4. Compostos Platinados.....	24
1.4.5. Antibióticos Antitumorais.....	24
1.5. Doxorrubicina.....	24
1.5.1. Aplicações clínicas.....	24
1.5.2. Dosagem.....	27
1.5.3. Mecanismo antitumoral.....	28
1.5.4. Farmacocinética.....	28
1.5.5. Efeitos adversos.....	30
1.6. Cardiotoxicidade da doxorrubicina.....	31

1.6.1.	Síndrome cardiotoxíco .....	31
1.6.2.	Dose cumulativa .....	32
1.6.3.	Cardiotoxicidade em medicina veterinária .....	33
1.6.4.	Cardiotoxicidade aguda .....	34
1.6.5.	Cardiotoxicidade Crónica .....	35
1.6.6.	Mecanismo de ação cardiotoxíco .....	36
1.6.6.1.	Stress Oxidativo .....	36
1.6.6.2.	Apoptose .....	40
1.6.6.3.	Desregulação do cálcio intracelular .....	42
1.6.6.4.	Doxorrubicinol .....	43
1.6.7.	Fatores de risco .....	43
1.6.8.	Diagnóstico .....	44
1.6.8.1.	História clínica e exame físico.....	44
1.6.8.2.	Biópsia miocárdica e análise histológica .....	44
1.6.8.3.	Eletrocardiografia .....	46
1.6.8.4.	Holter.....	47
1.6.8.5.	Radiografia torácica .....	48
1.6.8.6.	Ecocardiografia .....	48
1.6.8.7.	Biomarcadores Cardíacos.....	52
1.6.8.7.1.	Troponinas .....	52
1.6.8.7.2.	Péptidos Natriuréticos .....	55
1.6.8.8.	Outros métodos de diagnóstico .....	56
1.6.9.	Prevenção.....	57
1.6.9.1.	Agentes quimioterápicos alternativos.....	57
1.6.9.2.	Antioxidantes.....	58
1.6.9.3.	Doxorrubicina encapsulada em lipossomas.....	59
1.6.9.4.	Método de administração .....	60
2.	Objetivos .....	62
3.	Material e Métodos .....	63
3.1.	Critérios de seleção .....	63
3.2.	Critérios de interrupção.....	63
3.3.	Caracterização dos protocolos quimioterápicos e dos controlos do estudo.....	63
3.4.	Avaliação ecocardiográfica .....	64
3.4.1.	Determinação da concentração plasmática de Biomarcadores Cardíacos	65
3.5.	Análise Estatística.....	66

4. Resultados.....	67
4.1. Classificação da amostra.....	67
4.2. Parâmetros Ecocardiográficos.....	67
4.3. Biomarcadores Cardíacos.....	69
4.4. Análise estatística das variáveis.....	70
4.4.1. Parâmetros da Ecocardiografia em modo-M.....	70
4.4.2. Parâmetros da Ecocardiografia Bidimensional.....	72
4.4.3. Parâmetro da Ecocardiografia Doppler.....	74
4.4.4. Biomarcadores.....	75
5. Discussão de Resultados.....	76
6. Limitações do estudo.....	80
7. Conclusão.....	82
Bibliografia.....	83
Anexos.....	I

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1</b> – Parâmetros ecocardiográficos avaliados. ....	65
<b>Tabela 2</b> – Valores médios e desvio padrão dos parâmetros do modo-M.....	71
<b>Tabela 3</b> – Valores medianos dos parâmetros do modo-M.....	72
<b>Tabela 4</b> – Valores médios e desvio padrão dos parâmetros do modo 2D. <b>Error! Bookmark not defined.</b>	
<b>Tabela 5</b> – Valores medianos dos parâmetros do modo 2D.....	74
<b>Tabela 6</b> – Valores médios e desvio padrão do rácio E/A..... <b>Error! Bookmark not defined.</b>	
<b>Tabela 7</b> – Valores medianos do rácio E/A.....	74
<b>Tabela 8</b> – Valores médios e desvio padrão dos biomarcadores cardíacos. <b>Error! Bookmark not defined.</b>	
<b>Tabela 9</b> – Valores medianos dos biomarcadores cardíacos. .. <b>Error! Bookmark not defined.</b>	
<b>Tabela 10</b> – Protocolo CHOP (19 semanas).....	I
<b>Tabela 11</b> – Protocolo de agente único com doxorubicina .....	I

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> – Administração de quimioterapia intravenosa num cão.....	21
<b>Figura 2</b> – Cloridrato de doxorubicina.....	25
<b>Figura 3</b> – Administração de doxorubicina, através de um sistema de soro.....	29
<b>Figura 4</b> – Representação esquemática geral do ciclo redox da doxorubicina. ....	39
<b>Figura 5</b> – Imagem histológica das alterações miocárdicas associadas à cardiotoxicidade da doxorubicina.....	45
<b>Figura 6</b> – Alterações eletrocardiográficas associadas à cardiotoxicidade da doxorubicina: traçados eletrocardiográficos de dois grupos de ratos.....	47
<b>Figura 7</b> – Ecocardiografia: dilatação do ventrículo esquerdo e diminuição da contractilidade miocárdica. ....	49
<b>Figura 8</b> – Ecocardiografia: aumento do DVEs e do DVEd, diminuição da contractilidade e aumento da EPSS. ....	51
<b>Figura 9</b> – Valores ecocardiográficos em cães.....	I
<b>Figura 10</b> – Valores ecocardiográficos em cães, de acordo com o seu peso (Kg).....	II

<b>Figura 11</b> – Valores ecocardiográficos específicos para cadelas da raça Labrador.....	II
<b>Figura 12</b> – Valores ecocardiográficos em cães.....	III
<b>Figura 13</b> – Valores ecocardiográficos em cães.....	III
<b>Figura 14</b> – Valores ecocardiográficos em cães.....	III
<b>Figura 15</b> – Valores Ecocardiográficos em cães.....	IV

## Índice de gráficos

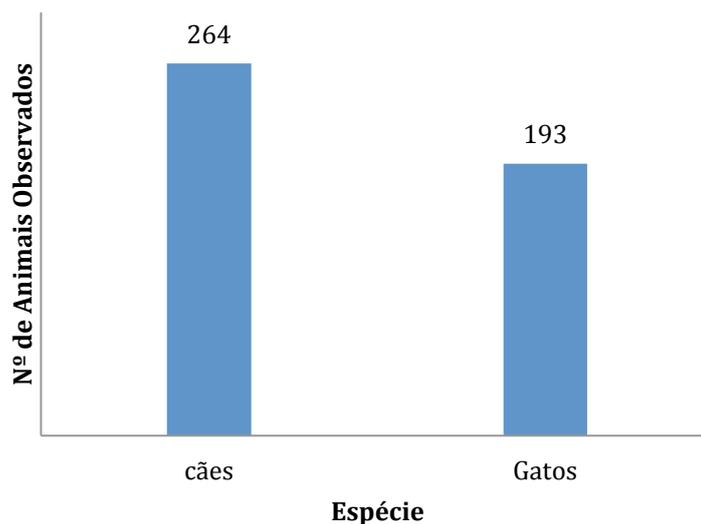
<b>Gráfico 1</b> – Número de animais observados durante o estágio.....	14
<b>Gráfico 2</b> – Frequências relativas dos diferentes tipos de consultas.....	15
<b>Gráfico 3</b> – Frequências relativas dos tipos de neoplasias diagnosticados.....	15
<b>Gráfico 4</b> – Frequências relativas das cirurgias realizadas.....	16
<b>Gráfico 5</b> – Valores medianos da fração de encurtamento.....	71
<b>Gráfico 6</b> – Valores medianos do diâmetro do ventrículo esquerdo em sístole.....	71
<b>Gráfico 7</b> – Valores medianos do diâmetro do ventrículo esquerdo em diástole.....	71
<b>Gráfico 8</b> – Valores medianos do volume do ventrículo esquerdo em sístole.....	72
<b>Gráfico 9</b> – Valores medianos do volume do ventrículo esquerdo em diástole.....	72
<b>Gráfico 10</b> – Valores medianos do rácio átrio esquerdo pela aorta.....	73
<b>Gráfico 11</b> – Valores medianos do diâmetro do átrio esquerdo.....	73
<b>Gráfico 12</b> – Valores medianos da fração de ejeção do ventrículo esquerdo.....	73
<b>Gráfico 13</b> – Valores medianos do rácio da onda E pela onda A (E/A).....	74
<b>Gráfico 14</b> – Valores medianos da cTnI.....	75
<b>Gráfico 15</b> – Valores medianos do pro-BNP.....	75

# 1. Introdução

## I. Descrição do estágio curricular

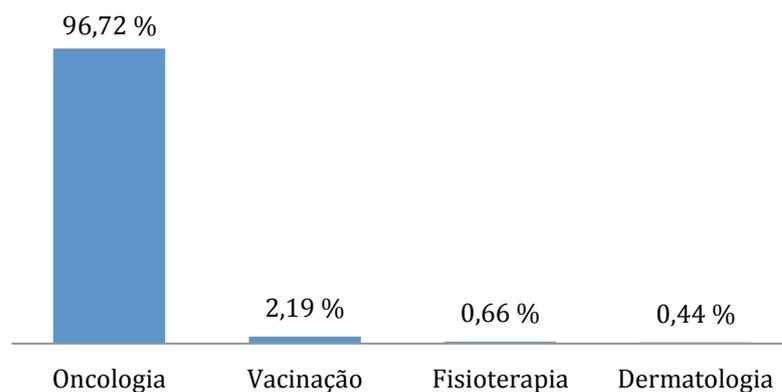
O presente estudo foi desenvolvido no Hospital Veterinário Berna, no decurso do estágio curricular final do mestrado integrado em Medicina Veterinária, o qual teve a duração de seis meses, tendo decorrido no período entre 1 de outubro de 2015 e 31 de março de 2016, sob a orientação do Doutor Joaquim Henriques. O Hospital Veterinário Berna, inicialmente designado de Centro Veterinário Berna, exerce atividade desde Setembro de 2012, a cargo da direção do Doutor Joaquim Henriques. A sua área de atuação é essencialmente a oncologia veterinária, dispondo, no entanto, de uma equipa multidisciplinar preparada para prestar cuidados veterinários em várias áreas da medicina de animais de companhia.

Durante o estágio, foram observados 457 animais, dos quais, 264 eram cães e 193 eram gatos (gráfico 1). Estes animais foram observados em ambiente de consulta, internamento e procedimentos cirúrgicos.



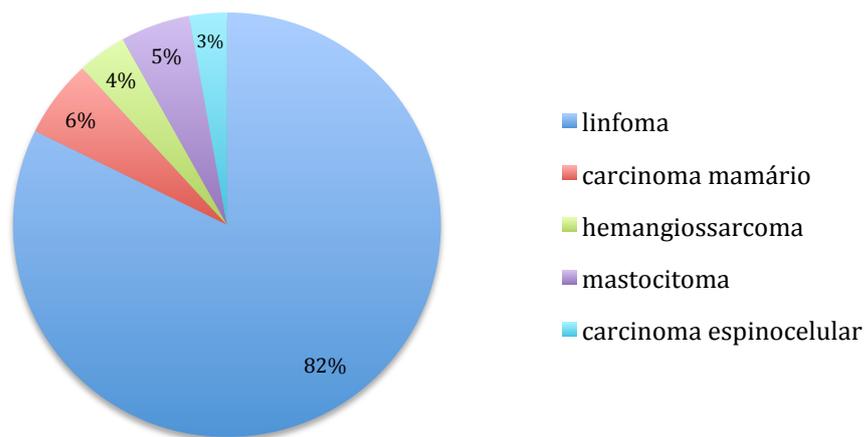
**Gráfico 1** – Número de animais observados durante o estágio, de acordo com a sua espécie.

Cerca de 97% dos casos assistidos em consulta eram animais oncológicos. Os restantes casos foram observados em vacinações, consultas de fisioterapia e consultas de dermatologia. O gráfico 2, ilustra as frequências relativas dos tipos de consulta assistidos.



**Gráfico 2** – Frequências relativas dos diferentes tipos de consultas.

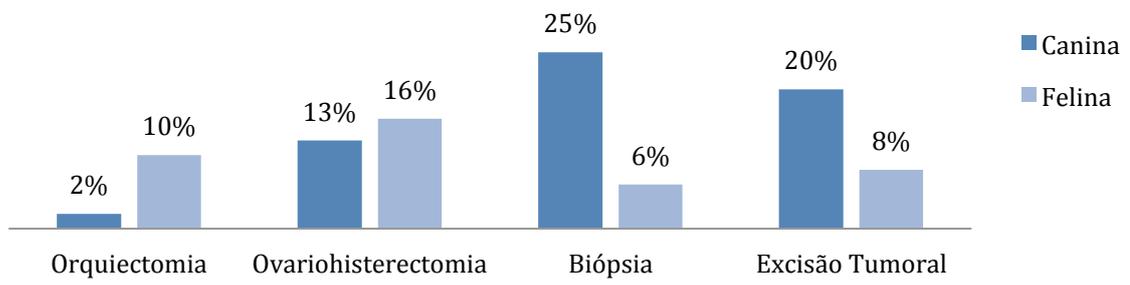
O linfoma foi o tumor mais frequentemente encontrado, seguindo-se o carcinoma mamário, mastocitoma, hemangiossarcoma e carcinoma espinocelular. No gráfico 3, observam-se as suas frequências relativas.



**Gráfico 3** – Frequências relativas dos tipos de neoplasias diagnosticados.

Relativamente às cirurgias realizadas, as mesmas perfizeram um total de 96 e envolveram excisões tumorais, ovariectomias, orquiectomias e biópsias de linfonodos.

O gráfico 4 ilustra as frequências relativas dos procedimentos cirúrgicos realizados, de acordo com a espécie.



**Gráfico 4** – Frequências relativas das cirurgias realizadas.

## **II. Revisão Bibliográfica**

### **1.1. Quimioterapia em Medicina Veterinária**

A prevalência de cancro em animais tem aumentado gradualmente nos últimos anos, sendo esta uma das principais causas de morte em pacientes geriátricos (Gustafson & Page, 2013; North, S. M. & Banks, 2009). De acordo com um estudo realizado em Itália, a incidência de cancro em cães tende a aumentar com a idade, atingindo o seu auge por volta dos 9 anos de idade, no entanto, a partir dos 11 anos esta tendência diminui (Merlo et al., 2008). Resultados semelhantes são relatados noutro estudo, realizado em 2003, com uma amostra de 345 *Rotweilers*, no qual, a grande maioria dos cães com idade superior a 13 anos apresentou uma menor mortalidade por causas neoplásicas, comparativamente aos animais geriátricos entre os 9 e os 10 anos de idade (Cooley et al., 2003). Com o atual aumento da população geriátrica, futuramente, é provável que o cancro se torne numa das principais causas de morbidade e mortalidade nos animais de companhia (Argyle, D. et al., 2008).

Cada vez mais proprietários optam por explorar opções de tratamento para os seus animais, deixando a eutanásia para último plano, não só porque para muitas pessoas os seus animais são membros integrantes da família, mas também devido à crescente informação e sensibilização para o cancro. Isto requer, por parte do clínico, uma correta compreensão de todos os aspetos da doença oncológica, bem como uma constante atualização de todas as opções terapêuticas disponíveis para os seus pacientes. O clínico deve, assim, considerar qual, ou quais, as terapias mais adequadas para cada paciente, alertando para as suas vantagens e desvantagens, sempre tendo em conta a qualidade de vida do animal, cabe, no entanto, aos proprietários a tomada de decisão final (Argyle, D. et al., 2008; North, S. M. & Banks, 2009).

Em medicina veterinária, o principal objetivo da quimioterapia é garantir a qualidade de vida dos animais, ainda que isso comprometa o seu tempo de vida. Como tal, os protocolos de quimioterapia são especialmente concebidos para produzirem mínimos efeitos secundários, apresentando, geralmente, uma boa tolerância por parte dos animais. A cura ou remissão completa do tumor é o desfecho ideal, no entanto, esta nem sempre é passível de ser alcançada sem comprometer o bem-estar dos animais. Por isso mesmo, o tratamento paliativo é, muitas vezes, a solução mais indicada, uma vez que a probabilidade de ocorrência de toxicidade pela quimioterapia torna-se reduzida, numa tentativa de prolongar a vida com a mínima qualidade (Argyle, D. et al., 2008; Hahn, K. A., 2002). Quer seja a cura ou a palição

o objetivo principal do tratamento, a remissão completa do tumor é sempre desejável, embora muitos animais consigam manter uma boa qualidade de vida apenas com uma resposta parcial, ou seja, uma redução de, pelo menos, 50% do volume tumoral (Hahn, K. A., 2002; North, S. M. & Banks, 2009).

## **1.2. Terapia Combinada Vs Monoterapia**

Um protocolo de quimioterapia pode ser constituído por combinações de fármacos ou apenas por um único fármaco. A combinação de quimioterápicos possui, geralmente, a capacidade de aumentar o potencial terapêutico e limitar a toxicidade individual de cada fármaco, se for corretamente planeada. Um protocolo deverá combinar quimioterápicos que demonstrem uma boa eficácia, quando administrados individualmente contra o mesmo tumor, sendo este um dos principais critérios da sua seleção (Gustafson & Page, 2013; Hahn, K. A., 2002; North, S. M. & Banks, 2009). Para aumentar a eficácia terapêutica de um protocolo é necessário haver um correto equilíbrio das doses de cada quimioterápico, as quais devem aproximar-se o mais possível da Dose Máxima Tolerada (DMT). A DMT consiste na máxima dose de fármaco que pode ser administrada sem provocar efeitos adversos irreversíveis ou toxicidade evidente, sendo este um critério de seleção igualmente importante (Gustafson & Page, 2013; North, S. M. & Banks, 2009).

A terapia combinada permite a utilização de uma dose citotóxica superior relativamente à monoterapia, a qual pode ser conseguida por um aumento da dose individual de cada fármaco ou pelo aumento da frequência das administrações (Gustafson & Page, 2013), no entanto, isto só é praticável quando os fármacos apresentam efeitos tóxicos diferentes (Hahn, K. A., 2002). Deste modo, outro critério a considerar na seleção de um protocolo é evitar uma sobreposição de toxicidades. Geralmente, fármacos com diferentes mecanismos de ação e diferentes vias metabólicas são mais eficazes quando combinados, pois, desta forma, mais dificilmente induzirão toxicidade (Hahn, K. A., 2002), ou criarão resistências por parte dos tumores (North, S. M. & Banks, 2009). É também importante definir corretamente o intervalo de tempo entre administrações, já que se, por um lado, este for muito curto, poderá aumentar a probabilidade de ocorrência de toxicidade, e, por outro lado, se for muito longo, poderá levar à ocorrência de resistências e repopulação das células tumorais (North, S. M. & Banks, 2009). Idealmente, o intervalo de tempo entre administrações deve ser o menor possível, de modo a permitir a recuperação do tecido normal

mais sensível e ao mesmo tempo manter a eficácia terapêutica (Gustafson & Page, 2013; North, S. M. & Banks, 2009).

Em medicina humana, a quimioterapia combinada, ao contrário da terapia com agente único, demonstrou efeitos curativos em casos de leucemia linfocítica aguda, doença de Hodgkin's, linfoma histiocítico e carcinoma testicular. Em medicina veterinária, a maior eficácia da terapia combinada é demonstrada, sobretudo, nos protocolos utilizados no tratamento do linfoma, no cão. Aqueles que combinam doxorubicina com outros agentes tendem a ser mais eficazes do que os protocolos com esta antraciclina como agente único (Gustafson & Page, 2013).

De uma forma geral, os protocolos de terapia combinada são mais eficazes, comparativamente à terapia com agente único, sendo que os últimos resultam em taxas de resposta inferiores e, portanto, menos duradouras (Gustafson & Page, 2013). Todos os fatores inerentes à escolha de um determinado tipo de protocolo devem ser discutidos abertamente entre o veterinário e os proprietários, nomeadamente, custos associados, tempo envolvido nos tratamentos, eficácia, objetivos terapêuticos, possíveis efeitos adversos e toxicidades e o nível de experiência do veterinário em relação ao protocolo em consideração (Gustafson & Page, 2013; Moore, A. S., 2010).

### **1.3. Toxicidade causada por quimioterápicos**

Os agentes quimioterápicos atuam por meio de um mecanismo de citotoxicidade, em células que se dividem rapidamente, sendo que alguns destes fármacos demonstram especificidade para as fases mais ativas do ciclo celular. De uma forma geral, quanto maior a fração de crescimento de uma população de células, maior a sua sensibilidade aos quimioterápicos (Hahn, K. A., 2002; North, S. M. & Banks, 2009). A fração de crescimento consiste na proporção de células que se replicam ativamente e é superior no início do desenvolvimento de um tumor, quando o seu tamanho ainda é microscópico. À medida que a massa tumoral se vai tornando macroscopicamente detetável, a sua fração de crescimento vai diminuindo, até alcançar uma fase de *plateau*. Assim, na prática, quanto mais pequeno for um tumor, maiores serão as probabilidades de eficácia terapêutica da quimioterapia (Dobson et al., 2008).

Os tecidos normais do organismo apresentam, na sua maioria, uma fração de crescimento lenta. Os tecidos podem ser classificados de acordo com o seu grau de

proliferação celular, em estáticos, se tiverem uma capacidade mitótica restrita (nervos ou músculo estriado); expansíveis, quando, normalmente, estão em repouso, mas cuja mitose pode ser induzida (órgãos e glândulas); e renováveis, se estão continuamente em divisão, apresentando uma fração de crescimento semelhante aos tecidos tumorais (células hematopoiéticas, células epiteliais da mucosa, epiderme) (Frimberger, 2010). A medula óssea, o tecido epitelial e o trato gastrointestinal, estando incluídos na última classificação, são os locais mais suscetíveis de sofrer toxicidade secundária à quimioterapia (Gustafson & Page, 2013; Hahn, K. A., 2002; North, S. M. & Banks, 2009). Alguns quimioterápicos apresentam uma propensão para induzir toxicidade noutros tecidos, como o trato urinário, miocárdio ou pâncreas (Hahn, K. A., 2002).

Idealmente, espera-se que os protocolos de quimioterapia em medicina veterinária resultem em menos de 5% de morbidade e menos de 1% de mortalidade, associadas a toxicidade (Gustafson & Page, 2013). Tais valores, prendem-se com o facto de, em medicina veterinária, se utilizarem doses muito mais baixas de quimioterápicos e protocolos minimamente agressivos, contrariamente ao que acontece em medicina humana (Hahn, K. A., 2002).

Tal como acontece com outros fármacos, a eficácia terapêutica dos quimioterápicos depende do seu índice terapêutico, ou seja, o rácio entre a dose tóxica e a dose terapêutica. No caso da maioria dos citotóxicos esse intervalo é muito curto, pelo que se deve ter especial cuidado na sua dosagem. Como já foi referido anteriormente, a dose de um fármaco citotóxico deve ser baseada, idealmente, na MTD, ou seja, a dose mais alta de um fármaco que, na curva dose-resposta, corresponde à mínima toxicidade (Gustafson & Page, 2013; Hahn, K. A., 2002; North, S. M. & Banks, 2009).

A toxicidade é o fator mais limitante na escolha da dose máxima de um quimioterápico (Kariyil, 2011). Na prática, a dose ideal depende muito do objetivo da quimioterapia. Assim, se esta for implementada para alcançar uma cura, é expectável algum risco de toxicidade; no entanto, se o objetivo apenas for um tratamento paliativo, a ocorrência de toxicidade pode ser evitada com doses mais baixas, mas, conseqüentemente, a probabilidade de remissão será mais baixa também (Hahn, K. A., 2002).

A sensibilidade dos tumores à quimioterapia depende de determinados fatores, nomeadamente, a absorção dos fármacos pelas células, a interação com alvos específicos nas mesmas, a indução de danos letais a macromoléculas celulares, a capacidade de reparação dos potenciais danos e a capacidade de resposta das células tumorais às lesões provocadas

(Gustafson & Page, 2013).

A ação citotóxica dos quimioterápicos está relacionada com a sua concentração em função do tempo, enquanto que a toxicidade e outros efeitos adversos dependem da presença de picos plasmáticos destes fármacos (Hahn, K. A., 2002; North, S. M. & Banks, 2009). Sendo assim, é recomendada a utilização de infusões lentas de citotóxicos, quando os mesmos são administrados por via endovenosa (figura 1), de forma a minimizar o risco de toxicidade (Hahn, K. A., 2002).



**Figura 1** – Administração de quimioterapia intravenosa num cão. (Adaptado do site do Bothell Pet Hospital - <https://bothellveterinarian.wordpress.com/page/6/>)

Vários fatores podem potenciar a toxicidade, nomeadamente, doenças concomitantes, disfunções de determinados órgãos ou sensibilidades raciais específicas, exigindo alterações no protocolo e nas dosagens dos quimioterápicos. É importante realizar uma monitorização contínua da tolerância e da resposta manifestadas pelo paciente ao longo do tratamento, de modo a averiguar a necessidade de modificações no protocolo. A dose ideal de cada quimioterápico é aquela que permite uma manutenção da qualidade de vida do paciente ao longo do tratamento, com os mínimos efeitos adversos (Gustafson & Page, 2013).

A toxicidade induzida por quimioterápicos pode ter um carácter imediato (se ocorrer durante o tratamento ou entre 24 a 48 horas após o mesmo), agudo com efeitos tardios (quando ocorre após 2 a 14 dias) ou crónico (se se manifestar após semanas, meses ou anos). Geralmente, os efeitos tóxicos mais imediatos devem-se a reações de hipersensibilidade por

libertação de histamina, associada a reações alérgicas ou desgranulações de mastócitos. Outras demonstrações de toxicidade aguda incluem náuseas e vômitos, como pode ser observado com a administração de cisplatina e outros agentes específicos, ou com uma infusão demasiado rápida de doxorubicina. Estes efeitos também podem surgir mais tardiamente, juntamente com diarreia e supressão da medula óssea (Gustafson & Page, 2013). Geralmente, as toxicidades gastrointestinais agudas de baixo impacto, com duração de 1 a 3 dias, não exigem uma redução da dose quimioterápica, sendo suficiente apenas um tratamento sintomático (Dobson et al., 2008). No caso de ocorrer uma toxicidade moderada, é aconselhada uma redução de 20% a 25% na dose seguinte de quimioterapia (Gustafson & Page, 2013). Se a toxicidade for mais severa, pode ser necessária uma redução de 25% a 50% da dose ou mesmo descontinuação do fármaco (Dobson et al., 2008).

A toxicidade hematológica, geralmente, é subclínica e manifesta-se sob a forma de citopenia (Dobson et al., 2008). Os neutrófilos são, frequentemente, as primeiras células a serem afetadas, seguidos das plaquetas. A ocorrência de neutropenia é bastante comum durante a quimioterapia, sendo o sinal mais frequente de toxicidade limitada pela dose. Normalmente, o nadir (contagem celular mais baixa) de neutrófilos, para a maioria dos quimioterápicos, ocorre entre 7 a 10 dias após o tratamento e a sua contagem volta a normalizar por volta de uma semana depois, tornando-se fundamental a realização de análises sanguíneas antes de cada tratamento (North, S. M. & Banks, 2009). No caso de a neutropenia demonstrar um elevado grau de severidade, pode ser necessária uma redução de 35% a 50% da dose de quimioterápicos (Dobson et al., 2008).

A toxicidade crônica e/ou cumulativa pode surgir, principalmente, como disfunção hepática (associada, frequentemente, à administração de lomustina), doença renal (associada à administração de cisplatina em cães e doxorubicina em gatos) ou manifestações cardíacas (associadas a uma sobredosagem de doxorubicina em cães) (Gustafson & Page, 2013; North, S. M. & Banks, 2009) e requer uma descontinuação dos quimioterápicos, tal como a ocorrência de toxicidade não relacionada com a dose, nomeadamente, um episódio de anafilaxia (Dobson et al., 2008).

## **1.4. Classes de quimioterápicos**

Os quimioterápicos podem ser classificados de acordo com o seu mecanismo de ação, em agentes alquilantes, antimetabolitos, agentes anti-microtúbulos, antibióticos

antitumorais e inibidores topoisomerase, referindo os mais importantes. Outros agentes incluem os compostos platinados (cisplatina e carboplatina) e a L-Asparaginase (Gustafson & Page, 2013).

#### **1.4.1. Agentes Alquilantes**

Este grupo de quimioterápicos é composto por fármacos como a ciclofosfamida, ifosfamida, lomustina, dacarbazina, entre outros. Os agentes alquilantes contêm grupos alquilo que reagem com os pares de bases do ácido desoxirribonucleico (ADN), através de ligações covalentes, quebrando as cadeias e gerando ligações cruzadas entre as mesmas, o que impede a replicação (Garden, 2010; Gustafson & Page, 2013; Monsuez et al., 2010). A atividade destes fármacos é independente do ciclo celular, uma vez que atuam, não só em células com divisão ativa, mas também, nas que estão em repouso (Garden, 2010).

#### **1.4.2. Antimetabolitos**

Após incorporação no ADN, os antimetabolitos atuam na fase de crescimento e divisão do ciclo celular, interferindo com a biossíntese dos ácidos nucleicos (Gustafson & Page, 2013), através da inibição da atividade enzimática, transcrição ou tradução (Garden, 2010). Este processo ocorre por competição ou substituição dos metabolitos envolvidos na replicação do ADN (Grem & Keith, 2005), com os quais, os antimetabolitos são estruturalmente semelhantes (Grem & Keith, 2005; Gustafson & Page, 2013). Alguns exemplos desta classe de quimioterápicos incluem a citarabina, metotrexato e fluorouracilo.

#### **1.4.3. Agentes Antimicrotubulos**

Estes agentes pertencem à classe dos taxanos, nomeadamente, paclitaxel e docetaxel, e dos vinca alcaloides, como a vincristina e a vimblastina. O seu mecanismo de ação passa pela interferência na função dos microtúbulos, estruturas envolvidas no processo de funcionamento e divisão celular, através da polimerização da tubulina (Gustafson & Page, 2013; Monsuez et al., 2010). Este grupo de fármacos tende a provocar complicações cardíacas numa pequena percentagem de pacientes, podendo mesmo potenciar o efeito cardiotoxico das antraciclinas (Monsuez et al., 2010).

#### **1.4.4. Compostos Platinados**

Os compostos platinados englobam a cisplatina e a carboplatina e atuam por meio de ligações covalentes ao ADN, levando à desregulação da estrutura normal das cadeias (Gustafson & Page, 2013). O uso da cisplatina está contraindicado em gatos, no entanto, ela é utilizada eficazmente no tratamento de osteossarcoma (Gustafson & Page, 2013; Moore, A. S., 2010) e carcinomas no cão (Moore, A. S., 2010). Os agentes platinados são bastante utilizados na quimioterapia intracavitária, juntamente com a mitoxantrona (Gustafson & Page, 2013; Moore, A. S., 2010) ou a doxorubicina (Gustafson & Page, 2013).

#### **1.4.5. Antibióticos Antitumorais**

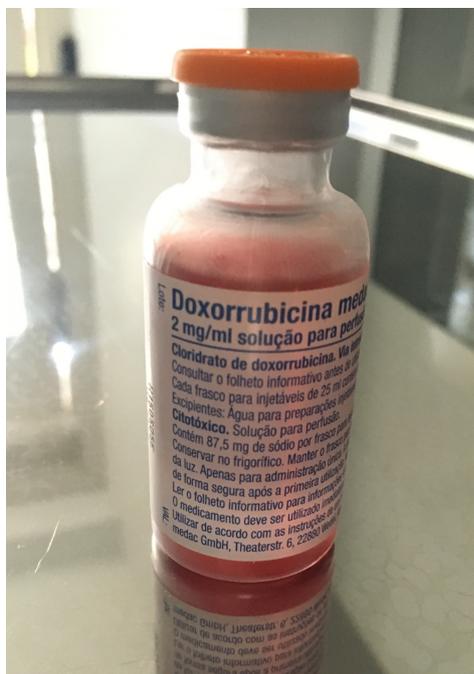
Este grupo de fármacos é proveniente de fermentação microbiana e inclui as actinomicinas, mitomicinas e antraciclinas (Gustafson & Page, 2013), sendo estas últimas as mais utilizadas (Hahn, K. A., 2002). A doxorubicina e a mitoxantrona são as antraciclinas mais utilizadas em oncologia veterinária e com um grande espectro de ação sobre várias doenças malignas, embora a doxorubicina seja superior. A idarrubicina e a epirubicina partilham o mesmo mecanismo de ação, no entanto, não são muito utilizadas na prática clínica oncológica. (Dobson et al., 2008) O seu efeito antitumoral passa pela intercalação no ADN e inibição da síntese de material genético, através da quebra das cadeias de ADN, formação de ligações cruzadas de pares de bases, produção de radicais livres e inibição da topoisomerase II (Argyle, D. et al., 2008). As antraciclinas, especialmente a doxorubicina, estão associadas à ocorrência de cardiotoxicidade (Gustafson & Page, 2013; Hahn, K. A., 2002; North, S. M. & Banks, 2009), como será abordado, de forma mais detalhada, no próximo capítulo (1.5. Doxorubicina).

### **1.5. Doxorubicina**

#### **1.5.1. Aplicações clínicas**

A doxorubicina (figura 2) foi uma das primeiras antraciclinas a ser descoberta, juntamente com a daunorrubicina, em 1960 (Minotti et al., 2004). Tal como a bleomicina e a

actinomicina D, deriva da fermentação bacteriana de *Streptomyces peucetius*, ao contrário da mitoxantrona, idarrubicina e epirrubicina, as quais são análogos sintéticos das antraciclinas (Dobson et al., 2008).



**Figura 2** – Cloridrato de doxorrubicina. (doxorrubicina utilizada no Hospital Veterinário Berna).

A doxorrubicina é considerada um dos agentes mais eficazes, quando o pretendido é um protocolo quimioterápico simples e conveniente, com um agente único (Argyle, D. J., 2008). A eficácia da sua utilização em monoterapia é superior no tratamento do linfoma, no cão, e em terapia combinada, no cão e no gato (Moore, A. S., 2010). Peaston et al. (1999) e Kristal et al. (2001) demonstraram que a doxorrubicina, quando utilizada como agente único no tratamento do linfoma felino, não revela uma boa eficácia, devendo ser aliada a um protocolo de terapia combinada. Os autores descreveram taxas de remissão completa (RC) de 32% e 26%, respetivamente, as quais contrastam com taxas de RC de 32% a 79%, descritas em estudos com protocolos de terapia combinada, tendo por base o protocolo COP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona) (Kristal et al., 2001).

A maioria dos protocolos utilizados no tratamento do linfoma canino consiste em variações do protocolo CHOP, constituído por ciclofosfamida (C), doxorrubicina (H, hidroxidaunorrubicina), vincristina (O, oncovina) e prednisona (P). Foram descritas taxas de

remissão de cerca de 80% a 95% em cães com linfoma tratados com este protocolo, com um tempo médio de sobrevivência (TMS) de 8 a 12 meses. Cerca de 20% a 25% destes animais sobrevivem até dois anos após o início da quimioterapia (Vail et al., 2013).

Inicialmente, os protocolos de quimioterapia utilizados no tratamento do linfoma eram mais longos, começando com uma fase mais intensiva de indução, na qual os fármacos eram administrados entre curtos intervalos de tempo, seguida de uma fase de manutenção, com intervalos de tempo superiores entre administrações. Atualmente, a maioria dos protocolos utilizados não apresenta fase de manutenção, uma vez que não há diferenças significativas, em termos estatísticos, em relação aos tempos de remissão e de sobrevivência entre os dois tipos de protocolos (Chun et al., 2000; Hahn, Kevin et al., 1992; Piek et al., 1999; Simon et al., 2008; Vail, 2010). O mais utilizado, atualmente, é o protocolo adaptado da Universidade Wisconsin–Madison, de 19 semanas, o qual não apresenta fase de manutenção (Vail et al., 2013).

Apesar do protocolo CHOP constituir o tratamento *gold standard* do linfoma canino, muitas vezes não é possível a sua implementação, seja por limitações monetárias dos proprietários, falta de disponibilidade para a comparência semanal nos tratamentos ou qualquer outra razão. Desta forma, se o proprietário o desejar, poderá optar por um protocolo com doxorrubicina como agente único (Lori et al., 2010), o qual se torna mais flexível e económico, por não exigir tantas visitas ao veterinário, poupando tempo e dinheiro aos proprietários (Vail, 2010). Foram descritas taxas de resposta de 59% a 85%, com períodos de remissão até 7 meses e períodos de sobrevivência até 9 meses, com a utilização da doxorrubicina apenas (Lori et al., 2010; Simon et al., 2008). Vários autores compararam a eficácia da terapia combinada e da monoterapia com doxorrubicina e os resultados não revelaram diferenças estatísticas significativas entre as taxas de remissão e períodos de sobrevivência das duas modalidades terapêuticas, elegendo a doxorrubicina como uma boa alternativa nos casos em que a terapia combinada não pode ser aplicada (Hahn et al. 1992; Higginbotham et al. 2013; Simon et al. 2008).

Alguns estudos demonstraram que a doxorrubicina é, também, o fármaco mais eficaz no tratamento do hemangiossarcoma (Wiley et al., 2010), sendo, por isso, o mais frequentemente utilizado como terapia adjuvante neste tumor, não só como agente único, mas também em terapia combinada com outros agentes, nomeadamente, ciclofosfamida ou ciclofosfamida e vincristina (protocolo VAC – vincristina, adriamicina, ciclofosfamida) (Bergman, 2010; Thamm, 2013). A quimioterapia adjuvante pode ser utilizada na tentativa de

diminuir as dimensões tumorais, facilitar a cirurgia ou mesmo aumentar o período de sobrevivência (Wiley et al., 2010).

A doxorubicina apresenta, ainda, bastante eficácia no tratamento do osteossarcoma e outros tumores mesenquimais e epiteliais, também como agente único ou em terapia combinada (Gustafson & Page, 2013). Em medicina humana é amplamente utilizada no tratamento do cancro da mama, tumores em crianças, sarcomas de tecidos moles e linfoma (Minotti et al., 2004).

### **1.5.2. Dosagem**

A dosagem recomendada de doxorubicina, em cães com mais de 15 Kg, é de 30 mg/m<sup>2</sup>, numa infusão ou bolus IV administrados lentamente, durante 10 a 30 minutos, a cada três semanas, perfazendo um total de cinco administrações. Para cães com menos de 15 Kg e gatos, recomenda-se uma dose de apenas 1 mg/Kg (Gustafson & Page, 2013). A maioria dos fármacos antineoplásicos são doseados de acordo com a área de superfície corporal (ASC) dos pacientes que os recebem. Pinkel (1958) verificou que este método de dosagem poderia normalizar a DMT dos quimioterápicos, sugerindo que tal se deveria ao facto da ASC ser um parâmetro que se relaciona melhor com as funções e processos fisiológicos que influenciam a atividade dos fármacos no organismo, comparativamente ao peso corporal, como já foi demonstrado noutros estudos. Isto permitiria uma melhor adaptação da dose à capacidade de metabolização de cada animal. Mais tarde, estudos descreveram um aumento de toxicidade em cães de pequeno porte, associado à dosagem segundo o método da ASC (Price & Frazier, 1998; Wittenburg et al., 2012). Inclusivamente, foi feito um estudo com doxorubicina, em cães, no qual a probabilidade de ocorrência de toxicidade aguda revelou uma proporcionalidade inversa ao peso dos animais (Ogilvie et al. 1989 apud Price et al. 1998). Estas evidências podem ser explicadas com o facto da fórmula de doseamento da ASC ter sido desenvolvida com base nas diferentes taxas metabólicas das várias espécies, não sendo específica para as diferentes raças pertencentes à mesma espécie (Wittenburg et al., 2012). Assim, com uma dosagem baseada na ASC, cães mais pequenos (<10 Kg) e gatos estão mais propensos a uma *overdose* de doxorubicina, traduzida por picos de concentrações plasmáticas, aumento da área sob a curva (AUC, *area under curve*) e aumento da semivida do fármaco (Dobson et al., 2008).

### 1.5.3. Mecanismo antitumoral

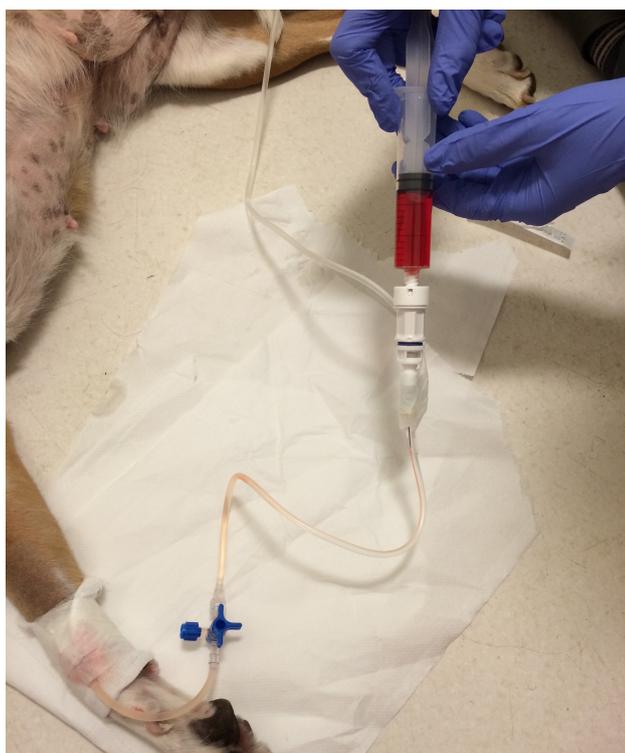
O mecanismo citotóxico da doxorubicina tem sido motivo de alguma controvérsia em vários estudos que debatem o tema. Embora não exista um consenso universal, uma vez que também não existem evidências claras de uma única teoria, foram propostos vários modelos acerca da atividade antineoplásica deste fármaco: intercalação na dupla hélice de ADN com subsequente inibição de síntese de macromoléculas, nomeadamente, ADN e ácido ribonucleico (ARN); formação de radicais livres, os quais levam à indução de lesões no ADN ou peroxidação lipídica; ligação ao ADN e sua alquilação; *crosslinking* no ADN; interferência na desespiralização ou na separação das cadeias de ADN e na atividade helicase; efeitos diretos na membrana; início da indução de danos no ADN, através da inibição da topoisomerase II; indução de morte celular por apoptose, decorrente da inibição da topoisomerase II (Gewirtz, 1999).

A polémica implícita nos mecanismos de ação propostos acima referidos assenta nas condições em que os mesmos se manifestaram. Gewirtz (1999) verificou que vários estudos *in vitro* descritos na literatura foram realizados com concentrações de doxorubicina acima das concentrações plasmáticas observadas na prática clínica, em pacientes que receberam bolus ou infusão contínua deste fármaco, questionando, assim, a credibilidade dos mecanismos de ação em condições normais. Gewirtz sugeriu, então, que todos os estudos realizados com concentrações de doxorubicina superiores a 2  $\mu\text{M}$  fossem reavaliados e concluiu que, sob concentrações que refletem o pico plasmático observado na prática clínica, é a interferência com a topoisomerase II que melhor traduz o mecanismo de ação da doxorubicina. A topoisomerase II é uma enzima capaz de quebrar as cadeias de dupla hélice do ADN durante a sua replicação, de forma a aliviar a tensão de torção das cadeias sobre elas mesmas, voltando a uni-las posteriormente. A doxorubicina interage com a topoisomerase II e com o ADN, formando um complexo que mantém o ADN no estado clivado, impedindo que a enzima volte a regenerar as cadeias (Minotti et al., 2004; Mitry & Edwards, 2016).

Outros mecanismos de ação foram propostos, nomeadamente, perturbação da homeostasia do cálcio celular, inibição da tioredoxina reductase (Gustafson & Page, 2013), formação de adutos e excesso de produção de ceramida (Yang et al., 2014).

### 1.5.4. Farmacocinética

Como já foi referido, os efeitos adversos da doxorubicina estão relacionados com o seu pico de concentração plasmática. Desta forma, é importante que o ritmo de administração seja lento. A doxorubicina pode ser administrada diretamente, com uma diluição prévia em cloreto de sódio (NaCl) 0,9%, ou, alternativamente, pode ser realizada uma infusão, através de um sistema de soro (figura 3), sempre de forma lenta e gradual (NaCl 0,9%) (Dobson et al., 2008).



**Figura 3** – Administração de doxorubicina, através de um sistema de soro.(cadela SRD, com linfoma, a fazer protocolo CHOP no HVB).

Para além de uma diminuição dos efeitos adversos, um ritmo de infusão lento reflete-se, também, numa maior AUC e numa maior fase de distribuição do quimioterápico. Após entrar no sistema sanguíneo venoso, a concentração de doxorubicina no sangue decresce, à medida que a mesma é distribuída para os tecidos (Gustafson et al., 2002). Terasaki et al. (1982) demonstraram que esta distribuição parece ser dependente da concentração de ADN nos tecidos. Além da sua ligação ao ADN, a doxorubicina apresenta, ainda, a capacidade de se unir a lípidos aniónicos, nomeadamente, a cardiolipina. (Gustafson et al., 2002).

Quimicamente, é constituída por um anel tetracíclico, unido por uma ponte

glicosídica a um monossacarídeo, a daunosamina. Os seus anéis adjacentes contêm, ainda, grupos quinona e hidroquinona, moléculas capazes de receber ou doar elétrões (Minotti et al., 2004). A metabolização da doxorubicina ocorre no fígado, formando-se o principal metabolito, doxorubicinol, através da redução do seu grupo carbonilo por aldo-ceto redutases. Forma-se também 7-hidroxiaglicona, por meio da clivagem redutiva do açúcar (Gustafson et al., 2002). Cerca de 50% deste quimioterápico é excretado na bÍlis através das fezes. Apenas 10% (3% no cão (Dobson et al., 2008)) é excretado pela via renal, através da urina, durante um período de 24 a 72 horas. A excreção ocorre sob a forma de metabolitos, biologicamente menos ativos que a doxorubicina (Moore, A. S., 2010).

### **1.5.5. Efeitos adversos**

Apesar do seu grande poder terapêutico, a Doxorubicina está associada à ocorrência de toxicidades limitantes da dose, nomeadamente, reações de hipersensibilidade, mielossupressão, toxicidade gastrointestinal e, sobretudo, cardiotoxicidade por dose cumulativa. Os gatos apresentam, ainda, um risco acrescido de desenvolver doença tubular renal (Gustafson & Page, 2013).

As reações de hipersensibilidade estão associadas à libertação de histamina e catecolaminas, decorrentes de um ritmo de infusão demasiado rápido, e podem traduzir-se em prurido, urticária, eritema, agitação da cabeça e vômitos. A mielossupressão é, geralmente, mais significativa quando se utilizam protocolos combinados. Algumas raças de cães apresentam uma maior predisposição para a ocorrência de alopecia e hiperpigmentação da pele, principalmente as raças Poodle, Cão Pastor Inglês e Terriers. Cães com uma pelagem comprida na zona da cauda e membros podem perder alguma densidade pilosa nessas zonas. Nos gatos é mais frequente ocorrer perda das vibrissas (Dobson et al., 2008).

A colocação incorreta ou deslocação do cateter para o espaço perivascular poderá causar um extravasamento de doxorubicina, o que constitui um sério problema. Numa fase inicial, o paciente poderá evidenciar dor, inchaço e eritema na zona do extravasamento (Hasinoff, 2008), ou até mesmo não ser notória qualquer reação no membro afetado, no entanto, após 5 a 7 dias é provável que ocorram episódios de claudicação, juntamente com um edema progressivo do membro e, eventualmente, ulceração (Dobson et al., 2008). No caso de suspeita de extravasamento, a infusão deverá ser imediatamente interrompida e realizada uma aspiração do conteúdo remanescente do cateter, antes da sua remoção (Dobson et al., 2008;

Gustafson & Page, 2013). Logo de seguida, deverá proceder-se à aplicação local de gelo, durante 15 minutos, a cada 6 horas, numa tentativa de limitar a área afetada. A administração intravenosa de dexrazoxano, numa dose de 400 a 600 mg/m<sup>2</sup>, poderá ser útil na diminuição dos efeitos decorrentes do extravasamento de doxorubicina. Esta deverá ser feita imediatamente após o incidente e poderá ser repetida após 24 a 48 horas (Dobson et al., 2008). O dexrazoxano é uma bisdioxopiperazina (inibidor catalítico da topoisomerase II), que também atua como quelante de ferro. Este fármaco foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) como agente cardioprotetor, utilizado na diminuição da cardiotoxicidade, em mulheres com cancro da mama metastático, que recebem uma dose cumulativa de doxorubicina superior a 300 mg/m<sup>2</sup>, de forma a manter um controlo do tumor. Mais recentemente, foi também aprovado como tratamento do extravasamento de antraciclinas (FitzPatrick et al., 2010). Em animais, a sua eficácia em casos de extravasamento foi relatada pela primeira vez por Langer et al. (2000), num estudo com ratos. Estes receberam doxorubicina, daunorubicina e idarrubicina, por via subcutânea e, posteriormente, um tratamento sistémico com dexrazoxano, por via intraperitoneal (IP), numa dose de 250 mg/kg. Uma única administração deste fármaco resultou numa atenuação da duração e da extensão das feridas ulceradas, reduzindo em 96% a AUC (área da ferida-duração). Os autores demonstraram, ainda, que uma dose tripla de 250 mg/kg, ao longo de 3 dias, seria mais eficaz do que uma única dose e que o dexrazoxano poderia ser administrado até 6 horas após o extravasamento, sem perda da proteção, no caso da doxorubicina. Em 2001, Langer et al. realizaram outro estudo com roedores, no qual o dexrazoxano revelou ser ainda mais eficaz com uma tripla administração (62,5 mg/kg, IP), 0, 3 e 6 horas após o extravasamento, tendo prevenido completamente qualquer lesão. Neste estudo comprovaram, também, que a administração intralesional de dexrazoxano, numa dose inferior de 50 mg/kg, não só atrasou o desenvolvimento de lesões, como também diminuiu o tempo de duração das mesmas. A eficácia do dexrazoxano foi, pela primeira vez, descrita em animais domésticos por Mahoney et al. (2007), num gato, e por FitzPatrick et al. (2010) e Venable et al. (2012), em cães. Em todos estes estudos, a dose de dexrazoxano utilizada correspondeu a 10 vezes a dose de doxorubicina administrada.

## **1.6. Cardiotoxicidade da doxorubicina**

### **1.6.1. Síndrome cardiotóxica**

A utilização da doxorubicina na prática clínica oncológica requer uma limitação da sua dose, particularmente, devido à possível ocorrência de cardiotoxicidade, tanto em humanos como em animais (Alves de Souza & Camacho, 2006; Gillings et al., 2009). Cães e gatos demonstram evidências de alterações cardíacas histológicas, contudo, evidências clínicas de cardiotoxicidade ainda não foram descritas em gatos (Frimberger, 2010). A cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina manifesta-se de forma semelhante à cardiomiopatia dilatada (CMD), produzindo alterações patológicas e funcionais idênticas no coração. Estas incluem, degeneração miocárdica com fibrose e ligeira inflamação, insuficiência miocárdica e dilatação das câmaras cardíacas (Boon, J., 2011a; Silva & Camacho, 2005). Clinicamente, este síndrome é caracterizado pela ocorrência de insuficiência cardíaca congestiva (ICC), alterações eletrocardiográficas, arritmias, hipotensão e morte súbita (Mauldin et al., 1992; Silva & Camacho, 2005).

### **1.6.2. Dose cumulativa**

A dose máxima total recomendada é de 240 mg/m<sup>2</sup> em cães (cerca de oito doses de doxorubicina) e 550 mg/m<sup>2</sup> em humanos (Dobson et al., 2008; Mauldin et al., 1992), sendo que, acima deste limiar, é muito provável que ocorra cardiomiopatia não inflamatória e ICC, em ambas as espécies (Mauldin et al., 1992). Estudos mais recentes recomendam uma dose máxima cumulativa inferior em humanos, de 500 mg/m<sup>2</sup> (Shi et al., 2011) ou mesmo 450 mg/m<sup>2</sup> (Angelis et al., 2016).

Na população canina, os efeitos cardiotoxícos são mais frequentes quando se utilizam doses acima de 180 mg/m<sup>2</sup> (Frimberger, 2010), à exceção das raças predispostas à cardiomiopatia dilatada, como os *Boxers* e os *Dobermans*, os quais, sendo mais sensíveis à toxicidade da doxorubicina, podem desenvolver disfunção cardíaca com doses muito inferiores a 180 mg/m<sup>2</sup> (Moore, A. & Frimberger, 2010). Na tentativa de reduzir este risco, a maioria dos protocolos quimioterápicos utilizados em medicina veterinária mantem uma margem de segurança, não ultrapassando o intervalo de 120 mg/m<sup>2</sup> a 150 mg/m<sup>2</sup>, o que equivale a quatro a cinco doses de doxorubicina (Gustafson & Page, 2013). No entanto, já foram descritas alterações cardíacas com uma dose média cumulativa de doxorubicina de 90 mg/m<sup>2</sup> (Mauldin et al., 1992; Pereira Neto, Andrade, Sousa, & Camacho, 2006; Susaneck, 1983, apud Ratterree, Gieger, Pariaut, Saelinger, & Strickland, 2012) e 93,75 mg/m<sup>2</sup> (Gillings et al., 2009).

### **1.6.3. Cardiotoxicidade em medicina veterinária**

Na população canina, a incidência de cardiomiopatia induzida pela doxorubicina, com consequente ICC compreende um intervalo de 2,3% a 8,6% (Ratterree et al., 2012) e, geralmente, os sinais clínicos ocorrem num período de seis a nove meses, desde o início das administrações (Dobson et al., 2008). O TMS de cães que desenvolvem ICC, secundária à administração de doxorubicina, varia entre 48 horas e 90 dias (Ratterree et al., 2012).

Em medicina humana, está descrita uma incidência de cardiotoxicidade clínica de 6,3% e subclínica de 17,9% (Angelis et al., 2016), no entanto, a maioria destes casos ocorre com uma dose de 550 mg/m<sup>2</sup> ou superior. Apenas 3% a 5% das pessoas desenvolve cardiotoxicidade com uma dose cumulativa de 400 mg/m<sup>2</sup> (Curigliano et al., 2016). Apesar da população canina manifestar uma menor incidência de cardiotoxicidade (o que pode estar relacionado com a menor severidade dos protocolos quimioterápicos em medicina veterinária e com a utilização de uma dose mais reduzida de doxorubicina), esta ocorre com doses muito inferiores às dos humanos, sugerindo que os cães poderão ser mais sensíveis ao efeito da doxorubicina comparativamente a estes últimos, um facto que é suportado por alguns autores (Mauldin et al., 1992; Pereira Neto et al., 2006).

Em 1992, Mauldin et al. caracterizaram a cardiotoxicidade da doxorubicina num grupo de cães, tendo relatado complicações cardíacas em 18% (32/175) dos animais, nomeadamente, arritmias, complexos ventriculares prematuros, desvios da onda R e outras alterações eletrocardiográficas. Deste grupo, 21,9% (7/32) desenvolveu ICC. Dilatação ventricular esquerda e diminuição da fração de encurtamento foram também observadas. Na necropsia, 13 cães evidenciaram alterações cardíacas histológicas, nomeadamente, degeneração vacuolar miocárdica não inflamatória, miocitólise, fibrose e arteriosclerose coronária intramural, alterações que foram igualmente observadas noutros casos de cardiotoxicidade em cães e humanos. Vários cães desenvolveram alterações cardíacas com doses cumulativas inferiores a 90 mg/m<sup>2</sup>.

Monnet et al. (1999), na tentativa de obter um modelo canino para o estudo das características patofisiológicas e do tratamento da cardiotoxicidade da doxorubicina em humanos, utilizaram este quimioterápico para tentar induzir sinais de insuficiência cardíaca em 32 cães. Foram realizadas infusões intracoronárias semanais, de 15 mg cada, durante quatro semanas, por meio de um cateter *Judkins* (Electro-Catheter Corporation, Rahway,

Nova Jérсия). Os autores descreveram uma taxa de mortalidade de 40,9% (9/22), sendo que, os restantes 59,1% (13/22) sobreviveram por 10 semanas, sem desenvolverem sinais de comprometimento cardíaco. Dois cães desenvolveram ICC e foram eutanasiados, quatro tiveram morte súbita, dois morreram durante a administração de doxorubicina, com sinais de insuficiência cardíaca, e um cão morreu com hepatite após término do protocolo. Os autores conseguiram induzir sinais de cardiomiopatia com uma dose cumulativa de 70 mg/m<sup>2</sup>.

Mais tarde, Pereira Neto et al. (2006) avaliaram a eficácia da eletrocardiografia ambulatoria (exame de Holter) na detecção de alterações cardíacas associadas à cardiotoxicidade da doxorubicina. Um grupo de 10 cães recebeu 30 mg/m<sup>2</sup> de doxorubicina, a cada 21 dias, até ao alcance de uma dose cumulativa de 180 mg/m<sup>2</sup> ou 240 mg/m<sup>2</sup>. Cinco cães desenvolveram sinais de disfunção cardíaca, três com uma dose cumulativa de 180 mg/m<sup>2</sup> e dois com 240 mg/m<sup>2</sup>. Graças ao Holter, foi possível avaliar prematura e continuamente os sinais de cardiomiopatia, nomeadamente, aumento do ritmo cardíaco e batimentos ectópicos, tais como, complexos ventriculares e atriais prematuros.

Mais recentemente, em 2011, Banco et al. descreveram um caso de cardiomiopatia, numa cadela que foi submetida a um protocolo de quimioterapia com doxorubicina e ciclofosfamida, após esplenectomia devido a um hemangiossarcoma. A doxorubicina foi administrada uma vez por semana, a cada três semanas, num total de seis tratamentos, perfazendo uma dose cumulativa inferior a 240 mg/m<sup>2</sup>. Após a última administração foi diagnosticada fraqueza geral, associada a insuficiência cardíaca e fibrilhação atrial, seguidas de morte súbita. O exame histopatológico do miocárdio revelou alterações compatíveis com cardiotoxicidade, destacando-se a ocorrência de degenerescência vacuolar.

Apesar da reduzida percentagem relatada de animais que desenvolvem sinais de cardiotoxicidade, este é um risco que está sempre associado à utilização da doxorubicina na prática clínica oncológica, pelo que se torna imprescindível um controlo completo e eficaz da função cardíaca, antes, durante e após o tratamento com este e outros quimioterápicos potencialmente cardiotoxícos. Só desta forma será possível detetar precocemente qualquer alteração cardíaca, de forma a adotar medidas profiláticas e/ou terapêuticas, no sentido de minimizar, reverter, ou mesmo prevenir uma possível cardiomiopatia.

#### **1.6.4. Cardiotoxicidade aguda**

A cardiotoxicidade aguda em cães, normalmente, ocorre minutos após a

administração de doxorubicina e é caracterizada, clinicamente, por hipotensão, alterações eletrocardiográficas, arritmias durante ou após a administração e um decréscimo temporário na função ventricular sistólica. Frequentemente, estes sinais são transitórios e não estão relacionados com a dose, podendo ocorrer após uma única administração de antraciclina (Alves de Souza & Camacho, 2006; Sawyer et al., 1999). Bristow, (1980) demonstrou que, após a administração de doxorubicina, ocorre uma liberação de substâncias vasoativas, nomeadamente, histamina, catecolaminas e prostaglandinas. Um ritmo de infusão rápido (2 minutos) de doxorubicina, produziu efeitos hemodinâmicos imediatos, semelhantes aos provocados pela histamina. Os mesmos efeitos permaneceram com um ritmo de infusão lento (5 mg/Kg/h), ainda que atenuados, tendo sido observados nos primeiros trinta minutos, após infusão. Estas alterações, refletem um aumento dos níveis séricos de histamina, o qual está relacionado com o pico de concentração plasmática da doxorubicina e incluem alterações vasculares periféricas, coronárias e miocárdicas. As catecolaminas e as prostaglandinas são libertadas posteriormente, agindo como antagonistas fisiológicos da histamina, no sentido de neutralizar os seus potenciais efeitos vasodilatadores. A sua ação produz um aumento do ritmo cardíaco e do fluxo coronário e um decréscimo da pressão arterial média, volume sistólico, pressão diastólica final do ventrículo esquerdo e da resistência vascular coronária. Estas alterações podem ser revertidas com a administração prévia de anti-histamínicos (Bristow, 1980).

Em medicina humana, fala-se, ainda, de cardiotoxicidade sub-aguda, a qual, se manifesta entre poucas semanas a alguns meses. Pensa-se que esta toxicidade esteja associada à disrupção da homeostase do cálcio ( $Ca^{2+}$ ), stress oxidativo ou alterações energéticas no miocárdio (Mitry & Edwards, 2016).

### **1.6.5. Cardiotoxicidade Crónica**

A cardiotoxicidade crónica é caracterizada por uma diminuição irreversível da função ventricular sistólica e um desenvolvimento progressivo de CMD secundária. A sua incidência é proporcional à dose cumulativa de doxorubicina, estando, portanto, associada a um tratamento prolongado com esta antraciclina. Quando em estado avançado, este síndrome é, geralmente, refratário ao tratamento (diuréticos,  $\beta$ -bloqueadores, inibidores da enzima conversora da angiotensina) (Shi et al., 2011) e pode resultar em ICC, mesmo após descontinuação do fármaco. Os animais afetados, normalmente, acabam por morrer devido à

ICC não responsiva ao tratamento ou ao agravamento de arritmias (Alves de Souza & Camacho, 2006; Sawyer et al., 1999).

No Homem, a incidência de cardiotoxicidade aguda é cerca de 11%, bastante superior à cardiotoxicidade crónica, com uma incidência de apenas 1,7%, no entanto, a última está associada a uma taxa de mortalidade superior a 50% (Chatterjee et al., 2010; Takemura & Fujiwara, 2007). A cardiotoxicidade crónica pode manifestar-se dentro de 30 dias após a última administração, ou mesmo 6 a 10 anos depois (Chatterjee et al., 2010).

### **1.6.6. Mecanismo de ação cardiotoxicó**

O mecanismo através do qual a doxorubicina exerce o seu efeito cardiotoxicó ainda permanece um pouco incerto, no entanto, pensa-se que a principal causa destas alterações possa estar relacionada com um aumento do stress oxidativo no coração, devido, em parte, a uma crescente formação de espécies reativas de oxigénio (ERO) e indução de peroxidação lipídica, acompanhadas de uma diminuição dos níveis de antioxidantes e grupos sulfidril (Berthiaume & Wallace, 2007; Davies & Doroshov, 1986; FitzPatrick et al., 2010; Octavia et al., 2012; Ratterree et al., 2012; Takemura & Fujiwara, 2007; Volkova & Russell, 2011).

Outros mecanismos são igualmente importantes na cardiotoxicidade da doxorubicina, nomeadamente, apoptose celular; inibição direta de transportadores envolvidos na homeostase iónica; alterações no metabolismo do ferro celular; desregulação do cálcio intracelular; disfunção mitocondrial e deterioração miofibrilar (Berthiaume & Wallace, 2007; Octavia et al., 2012); inibição dos ácidos nucleicos e síntese proteica; libertação de amins vasoativas; diminuição da expressão de genes cardíacos específicos; alteração da função adrenérgica (Chatterjee et al., 2010; Singal et al., 2000) e da atividade da enzima adenilato ciclase; modificações nos lisossomas, entre outros (Singal et al., 2000). Olson et al. (1988) defendem, ainda, o importante papel do doxorubicinol, o principal metabolito da doxorubicina no desenvolvimento da cardiotoxicidade crónica.

Todos estes mecanismos levam a crer que a causa da cardiotoxicidade da doxorubicina é, provavelmente, multifatorial e complexa, no entanto, muitos deles poderão estar secundariamente associados à produção de ERO e à peroxidação lipídica (Singal et al., 2000).

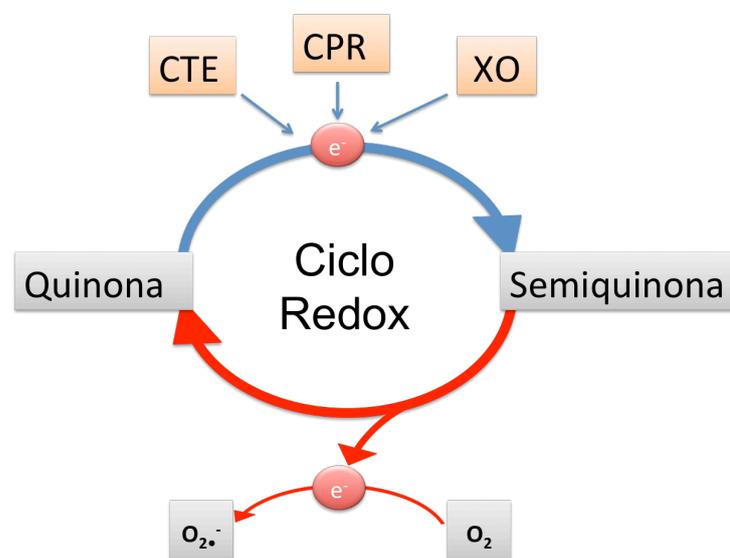
#### **1.6.6.1. Stress Oxidativo**

Atualmente, sabe-se que a indução da formação de radicais livres é o principal mecanismo envolvido na cardiotoxicidade da doxorubicina. Os radicais livres são moléculas ou átomos que contêm um ou mais elétrons desemparelhados na sua última camada electrónica, o que os torna altamente reativos (Octavia et al., 2012; Singal et al., 2000). A adição de um elétron à molécula de quinona da doxorubicina, após a sua intercalação no ADN, resulta na formação de um radical livre, uma semiquinona. Na presença de oxigénio, esta sofre uma auto-oxidação e regressa à sua forma original de quinona, enquanto o oxigénio é reduzido, formando-se o anião superóxido ( $O_2^-$ ). Inicia-se, assim, um ciclo de reações redox (oxidação-redução), levando a um aumento de superóxido e outras ERO (Davies & Doroshov, 1986; Minotti et al., 2004; Young et al., 1981), as quais são formadas pela interação do oxigénio com radicais livres. (Berthiaume & Wallace, 2007). A enzima superóxido dismutase é capaz de induzir a conversão do superóxido em peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), um derivado não radical do oxigénio (Singal et al., 2000). Simultaneamente, ocorre a libertação de moléculas de ferro das reservas intracelulares. A interação da doxorubicina com o ferro resulta na formação de complexos, capazes de converter o  $O_2^-$  e o  $H_2O_2$  em radicais hidroxilo (Minotti et al., 2004). Estes últimos podem, de seguida, reagir com ácidos gordos polinsaturados da membrana, levando a uma peroxidação lipídica (Singal et al., 2000).

A capacidade de indução da formação de radicais livres pelas antraciclina foi, pela primeira vez, demonstrada por Sato et al. (1975). Os autores provaram que esta é uma propriedade inerente aos fármacos antineoplásicos que contêm quinonas na sua estrutura. Myers et al. (1977) demonstraram as primeiras evidências da formação de radicais livres, a partir da doxorubicina, ao administrarem alfa-tocoferol (vitamina E), um potente antioxidante com a capacidade de inibir a formação de peróxidos lipídicos, em ratos previamente injetados com a antraciclina. Os autores comprovaram diretamente, por microscopia eletrónica, que este antioxidante diminuiu os sinais de cardiomiopatia nos animais, sem interferir no mecanismo antineoplásico da doxorubicina. Estes resultados levaram a crer que a peroxidação lipídica teria um importante papel na cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina. A mesma teoria foi comprovada indiretamente, através da deteção de um aumento na produção de malondialdeído, um produto da peroxidação lipídica, em animais tratados com doxorubicina.

Vários estudos revelaram a existência de locais específicos na célula, onde a acumulação de doxorubicina ocorre em maior escala, nomeadamente, a mitocôndria e o

núcleo. De facto, as mitocôndrias são os organelos mais afetados pelo efeito cardiotoxico da doxorubicina (Berthiaume & Wallace, 2007; FitzPatrick et al., 2010; Nicolay et al., 1986; Takemura & Fujiwara, 2007). Atualmente, sabe-se que várias enzimas estão envolvidas no ciclo redox da doxorubicina (figura 4). (Berthiaume & Wallace, 2007; Davies & Doroshov, 1986; Takemura & Fujiwara, 2007). Goodman et al. (1977), demonstraram que a enzima NADPH citocromo P450 redutase (CPR) seria capaz de catalisar a produção de superóxido, a partir da antraciclina. Bachur et al. (1979), confirmaram o papel da enzima microsossomal P450 redutase na redução da quinona da doxorubicina, levando à formação de radicais livres e, conseqüentemente, dano e morte celulares. Pan et al. (1980), demonstraram que a enzima xantina oxidase (XO) também está envolvida nas reações de redução da doxorubicina e da daunorrubicina, embora o seu poder de conversão não seja tão notório. Davies & Doroshov (1986) descreveram, num estudo *in vitro* com tecido cardíaco, que o Complexo I da cadeia transportadora de elétrons (CTE), da mitocôndria, seria o local onde ocorre a redução da doxorubicina, catalisada pela NADH desidrogenase. Mais tarde, Vásquez-Vivar et al. (1997) demonstraram que o domínio redutase da isoforma endotelial da enzima sintase do óxido nítrico (eNOS), também apresenta a capacidade de reduzir a doxorubicina na sua forma semiquinona, num processo que provoca a monomerização da enzima. Como resultado, é favorecida a produção de superóxido, em detrimento da produção de óxido nítrico. A interação deste último com uma concentração crescente de ERO, promove a formação de peroxinitrite, um potente radical livre capaz de atravessar a membrana lipídica e atingir o núcleo e as mitocôndrias, exacerbando os efeitos do stress oxidativo nos cardiomiócitos (Mitry & Edwards, 2016).



**Figura 4** – Representação esquemática geral do ciclo redox da doxorubicina. (Adaptado de Zhu et al., 2016).

As grandes necessidades energéticas do coração, comparativamente a outros tecidos, tornam os cardiomiócitos muito mais sensíveis ao stress oxidativo provocado pela doxorubicina (Berthiaume & Wallace, 2007; Volkova & Russell, 2011). De facto, as células cardíacas exigem um elevado e constante fornecimento de ATP, por via da fosforilação oxidativa, o que torna fundamental o papel da CTE e das mitocôndrias. O coração apresenta uma maior densidade de mitocôndrias por unidade de células cardíacas, relativamente a outros tecidos. Em média, a densidade mitocondrial ocupa cerca de 25% a 35% do volume de cada cardiomiócito (Berthiaume & Wallace, 2007), sendo que estes organelos são responsáveis pela produção de mais de 90% do ATP utilizado pelas células cardíacas (Octavia et al., 2012). As células tumorais possuem um número muito menor de mitocôndrias devido ao seu metabolismo, essencialmente, glicolítico, de forma que danos oxidativos provocados pela doxorubicina nestas células apenas são observados com concentrações muito superiores do quimioterápico (Volkova & Russell, 2011).

O fígado também participa na redução da doxorubicina, ainda que em menor escala. Graças ao seu importante papel no metabolismo dos xenobióticos, os hepatócitos possuem um vasto grupo de enzimas citocromos P450 no retículo endoplasmático, as quais são responsáveis por uma pequena parte da redução da doxorubicina neste órgão. No coração, a expressão destas enzimas, bem como o volume ocupado pelo retículo endoplasmático, é muito menor. Por outro lado, há a uma maior disponibilidade da CTE (e do complexo I), o que aumenta a probabilidade do ciclo redox da doxorubicina ocorrer nas mitocôndrias (Berthiaume & Wallace, 2007). Outro facto que sustenta a importância das mitocôndrias, relaciona-se com a interação da doxorubicina com componentes da membrana mitocondrial. A membrana interna, que contém as proteínas da CTE, possui uma grande percentagem de cardiolipinas, as quais se ligam às anteriores, de modo a assegurar o seu correto funcionamento. A doxorubicina apresenta uma grande afinidade para a cardiolipina, formando complexos praticamente irreversíveis com esta e impedindo a sua interação com as proteínas da cadeia, o que pode resultar na inibição do fluxo de eletrões através da mesma. Consequentemente, irá ocorrer um aumento da transferência de eletrões para as moléculas de oxigénio, potenciando a formação de radicais livres (Berthiaume & Wallace, 2007; Nicolay et al., 1986; Schlame et al., 2000). O aumento da produção de ERO conduz a uma série de

alterações na mitocôndria, que acabam por culminar na perda da sua função e redução dos níveis de ATP (Adenosina Trifosfato, do inglês Adenoside triphosphate) (Berthiaume & Wallace, 2007; Octavia et al., 2012; Schlame et al., 2000).

Apesar de já ser conhecido o mecanismo de formação de radicais livres a partir das mitocôndrias, na presença de doxorubicina muitos dos estudos nesta matéria foram realizados com concentrações supraclínicas do quimioterápico (Berthiaume & Wallace, 2007; Minotti et al., 2004; Octavia et al., 2012). No entanto, doses clinicamente normais de doxorubicina também podem induzir efeitos diretos na função mitocondrial, apesar de estes serem menos severos (Octavia et al., 2012).

As mitocôndrias são os principais organelos afetados numa fase inicial da cardiotoxicidade, e a partir dos quais surgem os efeitos cardíacos agudos. Por outro lado, os efeitos da cardiotoxicidade crónica estão associados à intercalação da doxorubicina no ADN nuclear, bem como à sua interferência nos processos de síntese proteica (Nicolay et al., 1986).

#### **1.6.6.2. Apoptose**

A apoptose, ou morte celular programada das células cardíacas, foi proposta como sendo um dos mecanismos envolvidos na cardiotoxicidade da doxorubicina responsável pela degeneração do miocárdio (Kotamraju et al., 2000; Kumar et al., 1999; Sawyer et al., 1999; Wang, L. et al., 1998). Estudos demonstraram a ocorrência de apoptose em células endoteliais cardíacas e cardiomiócitos, após administração de doses submicromolares de doxorubicina. A morte celular apoptótica foi induzida pela ativação da caspase-3 e fragmentação do ADN (Kotamraju et al., 2000; Sawyer et al., 1999; Wang, L. et al., 1998). Kumar et al. (1999), submeteram cardiomiócitos isolados de ratos adultos a concentrações crescentes de doxorubicina (10–40  $\mu\text{M}$ ), o que resultou numa alteração gradual da morfologia celular, aumento da fragmentação nuclear e, finalmente, apoptose, ao longo de 23 horas após o tratamento. Estes resultados sugerem que a doxorubicina é capaz de provocar apoptose nos cardiomiócitos, num processo dependente do tempo e da dose. A coloração com Hoechst 33258 e a aplicação da técnica de Tunel, confirmaram as alterações apoptóticas acima descritas, enquanto que a técnica de eletroforese em gel de agarose revelou uma maior fragmentação de ADN nas células expostas à doxorubicina, compatível, também, com um processo de apoptose (Kumar et al., 1999).

A apoptose pode ser induzida por vários estímulos, embora todos culminem na

ativação de caspases, por dois mecanismos distintos. O mecanismo extrínseco é iniciado pela formação de um complexo entre o recetor de morte da membrana, Fas, e a proteína Fadd (do inglês, Fas receptor-associated death domain), os quais acabam por ativar as caspases iniciadoras. O mecanismo intrínseco envolve a libertação do citocromo c, por aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial, o qual, juntamente com o fator de ativação da apoptose (Apaf-1, do inglês apoptosis activating factor) e com a pro-caspase-9, irá formar o apoptossoma levando, assim, à ativação da caspase-9. Esta, por sua vez, induz a ativação de caspases efetoras, como a caspase-3 (Kalyanaraman et al., 2002).

Wang et al., (1998) demonstraram que o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) é capaz de inibir a apoptose induzida pela doxorrubicina, nos cardiomiócitos, ao atenuar a indução do gene proapoptótico Bax e a ativação da caspase-3 e inibindo a fragmentação do ADN.

Vários estudos propõem o aumento do stress oxidativo como um dos fatores desencadeadores do sinal apoptótico, levando à morte dos cardiomiócitos (Kotamraju et al., 2000; Kumar et al., 1999; Octavia et al., 2012; Sawyer et al., 1999). No seu estudo, Kumar et al. (1999) demonstraram, ainda, que a morte celular programada dos cardiomiócitos diminuiu bastante com a administração de Trolox, um análogo da vitamina E e antioxidante, evidenciando o envolvimento do stress oxidativo na ocorrência de apoptose. Alguns autores defendem que o peróxido de hidrogénio é o principal responsável por este fenómeno (Kalivendi et al., 2001; Kotamraju et al., 2000), enquanto que, para outros, a indução da apoptose deve-se, essencialmente, ao anião superóxido e, em menor escala, ao peróxido de hidrogénio (Sawyer et al., 1999). Segundo Harsdorf, Li, & Dietz, (1999), o  $O_2^-$  e o  $H_2O_2$  são capazes de induzir diferentes mecanismos apoptóticos nos cardiomiócitos. Por exemplo, o  $H_2O_2$  pode promover a libertação do citocromo c da mitocôndria, enquanto o  $O_2^-$  atua por outros mecanismos. Ambas as ERO apresentam a capacidade de promover a expressão da proteína p53, a qual pode induzir diretamente a apoptose, através da ativação do gene proapoptótico Bax (Harsdorf et al., 1999).

Atualmente, sabe-se que a ocorrência de apoptose está também relacionada com a ativação do ciclo redox da doxorrubicina pela enzima eNOS. Kalivendi, Kotamraju, Zhao, Joseph, & Kalyanaraman, (2001) demonstraram que o tratamento com doxorrubicina, em células endoteliais aórticas de bovino, provoca um aumento da transcrição da enzima eNOS e respetiva atividade proteica, sendo este aumento dependente da libertação de cálcio intracelular e da formação de  $H_2O_2$ . Os autores, verificaram que a administração de

antioxidantes e de quelantes de cálcio diminuiu a expressão de eNOS e a apoptose celular, referindo, também, o papel do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na morte celular programada. Outros estudos demonstram que a doxorrubicina induz um aumento dos níveis de cálcio nas células (Kusuoka et al., 1991), e que este, por sua vez, promove a expressão da enzima eNOS (Lin et al., 2000), o que vai de encontro aos resultados observados. Adicionalmente, o pré-tratamento das células com ARN mensageiro (mRNA) antisense da referida enzima, cujo objetivo seria a inibição da transcrição e diminuição dos níveis de proteína eNOS, também surtiu uma diminuição da apoptose das células endoteliais.

### **1.6.6.3. Desregulação do cálcio intracelular**

A capacidade contráctil do coração está relacionada com a concentração de cálcio no citosol. Nas células musculares, o retículo sarcoplasmático (RS) constitui o principal local de armazenamento de cálcio e, em resposta a um potencial de ação, este é libertado para que ocorra a contração muscular. Os canais de libertação de cálcio, no RS, exercem um importante papel no processo de contração e relaxamento do músculo cardíaco e um aumento na concentração de cálcio no citosol, durante o potencial de ação, constitui o estímulo para a abertura destes canais - libertação de cálcio induzida pelo cálcio (Holmberg & Williams, 1990).

Holmberg & Williams (1990) demonstraram que a doxorrubicina é capaz de induzir a saída de cálcio do retículo sarcoplasmático, ao aumentar as probabilidades de ligação da rianodina aos seus canais e de estes permanecerem abertos, num processo dependente da dose. A depleção das reservas de cálcio, no RS, resultam numa redução da força contráctil, uma vez que a sua disponibilidade para se ligar ao complexo actina-miosina, torna-se também inferior. Paralelamente, a sua acumulação no citosol, durante a diástole, irá interferir com o relaxamento do músculo cardíaco. Este aumento da concentração de cálcio intracelular poderá, ainda, ativar proteases capazes de danificar as miofibrilhas e potenciar as alterações histológicas associadas à cardiotoxicidade da doxorrubicina (FitzPatrick et al., 2010; Holmberg & Williams, 1990).

O doxorrubicinol exerce um papel essencial na desregulação da homeostase do cálcio intracelular. Para além de interferir com o receptor de rianodina, levando a um efluxo descontrolado de cálcio do RS, o principal metabolito da doxorrubicina é capaz de comprometer o armazenamento de cálcio neste organelo, ao alterar a bomba de cálcio do RS

(SERCA), na sua membrana. O doxorubicinol pode, ainda, afetar a bomba de sódio/potássio no sarcolema dos cardiomiócitos, e alterar o gradiente de sódio, necessário para entrada de cálcio nas células musculares cardíacas (Mitry & Edwards, 2016). A desregulação da concentração de cálcio intracelular, pode ser uma causa ou um efeito da formação de ERO. A sua associação foi demonstrada por Kalivendi et al., (2001), num estudo que revelou a inibição da formação de ERO e da apoptose celular, com a administração de quelantes de cálcio. As ERO e o peróxido de hidrogénio, tal como o doxorubicinol, são capazes de alterar a homeostase do cálcio, através dos mecanismos acima descritos, levando a um aumento da sua concentração intracelular (FitzPatrick et al., 2010; Octavia et al., 2012).

#### **1.6.6.4. Doxorubicinol**

Olson et al. (1988) demonstraram, através de testes *in vitro*, que o doxorubicinol é mais cardiotoxíco do que a própria doxorubicina, sugerindo que este poderia acumular-se no coração e ser o grande impulsionador da cardiotoxicidade crónica, induzida pela referida antraciclina. Os autores comprovaram que o metabolito exerce um papel mais proeminente no comprometimento das funções cardíacas sistólica e diastólica, bem como na inibição da bomba de cálcio do RS do músculo cardíaco, em comparação com a doxorubicina. Em contraste com estes resultados, Gilbert et al. (2006, 2007) realizaram um estudo com catatuas e outro com cães, nos quais não foi relatada evidência clínica de toxicidade durante um período de seguimento de três semanas, após uma administração única de doxorubicinol.

#### **1.6.7. Fatores de risco**

Vários fatores de risco associados à cardiotoxicidade crónica induzida pela doxorubicina foram identificados, essencialmente, no Homem. Destes, destacam-se indivíduos geriátricos (com idade superior a 70 anos); crianças submetidas a tratamento com doxorubicina (maior risco de desenvolver cardiotoxicidade na idade adulta); radiação ionizante com incidência no tórax; doenças cardíacas pré-existentes (particularmente, ICC ativa, enfarte do miocárdio recente, hipertensão, estenose aórtica, diabetes mellitus e administração prévia de antraciclinas); administração simultânea de outros agentes citotóxicos, nomeadamente, ciclofosfamida, paclitaxel e trastuzumab e indivíduos do sexo feminino (FitzPatrick et al., 2010; Gillings et al., 2009; Mitry & Edwards, 2016; Octavia et

al., 2012).

Na espécie canina, o peso corporal foi o único fator descrito como um potencial risco no desenvolvimento de ICC (Postorino, Susaneck, Withrow, Macy, & Harris, 1989, apud FitzPatrick et al., 2010). Apesar de ser, ainda, um assunto controverso nesta espécie, pensa-se que alguns fatores de risco descritos nos humanos possam, também, abranger os cães, nomeadamente, dose cumulativa de doxorrubicina superior a 180-240 mg/m<sup>2</sup>, história de doença cardíaca pré-existente (FitzPatrick et al., 2010), quimioterapia simultânea com ciclofosfamida, radioterapia no mediastino e idade avançada (Gillings et al., 2009). No entanto, Gillings et al., (2009) investigaram alguns destes fatores de risco num grupo de 133 cães, não tendo encontrado nenhuma associação com o desenvolvimento de cardiotoxicidade. Em estudos que avaliaram protocolos de terapia combinada com doxorrubicina e ciclofosfamida também não foi relatada nenhuma diferença estatística significativa na ocorrência de cardiotoxicidade, comparativamente aos protocolos de monoterapia com doxorrubicina (Lori et al., 2010; Price et al., 1991).

## **1.6.8. Diagnóstico**

### **1.6.8.1. História clínica e exame físico**

Vários métodos têm sido postos em prática, na tentativa de detetar precocemente sinais de disfunção cardíaca, que possam estar associados à quimioterapia com doxorrubicina. Uma abordagem inicial consiste na recolha da história clínica do paciente, bem como na realização de um exame completo do sistema cardiovascular (Chatterjee et al., 2010). A presença de sinais clínicos, como, intolerância ao exercício, dispneia, tosse, hepatomegália e ascite, pode estar associada com cardiomiopatia dilatada (Ratterree et al., 2012; Smith Jr. et al., 2008).

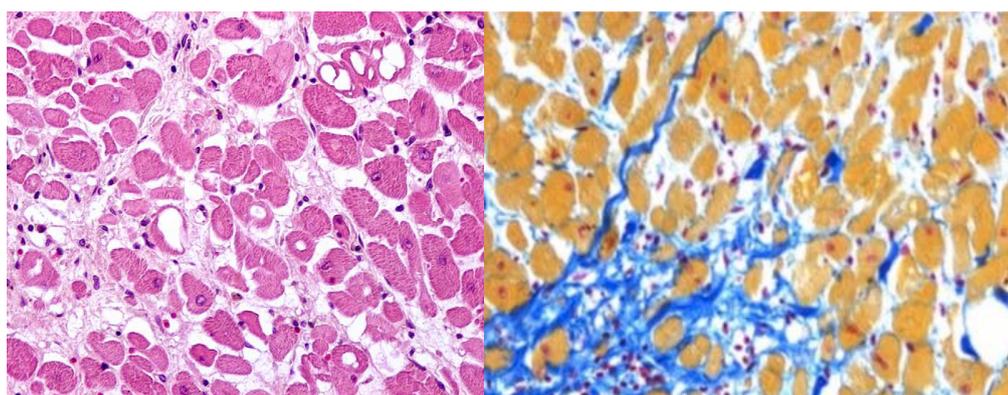
### **1.6.8.2. Biópsia miocárdica e análise histológica**

Graças à sua elevada especificidade e sensibilidade, a biópsia endomiocárdica do ventrículo direito, constitui o *gold standard* para a deteção de cardiotoxicidade aguda, induzida pela doxorrubicina (Lee, Y. et al., 2015; Octavia et al., 2012).

Os achados histológicos do miocárdio, frequentemente associados ao diagnóstico de cardiomiopatia induzida pela doxorrubicina, incluem perda de miofibrilhas, distensão do

retículo sarcoplasmático, degeneração vacuolar (células ádria), miocitólise, atrofia dos miócitos e fibrose (Chatterjee et al., 2010; Hanai et al., 1996; Lee, Y. et al., 2015; Monsuez et al., 2010; Silva & Camacho, 2005). A figura 5, ilustra algumas destas alterações.

A biópsia miocárdica também é utilizada para quantificar a severidade da cardiotoxicidade (Chatterjee et al., 2010), no entanto, poderá ser demasiado sensível, levando a uma interpretação sobrevalorizada, que irá resultar num adiamento ou descontinuação do tratamento, quando ainda poderá existir uma reserva cardíaca adequada para o mesmo (Ratterre e et al., 2012).



**Figura 5** – Imagem histológica das alterações miocárdicas associadas à cardiotoxicidade da doxorrubicina. A – Degeneração vacuolar/células ádria; grupos de cardiomiócitos fragmentados alternados com miócitos aparentemente normais. B – Cardiomiócitos (laranja) separados por edema e tecido fibroso (azul). (Adaptado de Banco et al., 2011).

A severidade das alterações histológicas do miocárdio é, normalmente, quantificada através de uma escala gradativa utilizada por vários autores, em medicina humana. Nesta escala, a amostra pode ser classificada com base na percentagem de células com alterações típicas, em “0” (se as células não demonstram alterações), “1” (menos de 5% de células podem apresentar perda de miofibrilhas ou alterações no RS), “1,5” (pequenos grupos de células, entre 5-15%, podem apresentar perda marcada de miofibrilhas e/ou vacuolização do citoplasma), “2” (16-25%), “2,5” (26-35%) e “3” (>35% de células com alterações difusas, perda de organelos e alguma capacidade contráctil, degeneração mitocondrial e nuclear). Uma classificação de 2,5, ou superior, é um forte indício de que a administração de doxorrubicina deve ser interrompida (Bristow et al., 1982; Octavia et al., 2012; Torti et al., 1986). Geralmente, o grau de severidade das alterações histológicas está relacionado, quase linearmente, com a dose de doxorrubicina administrada (Bristow et al., 1982) No entanto, já foram relatados sinais ecocardiográficos compatíveis com cardiotoxicidade (disfunção

sistólica severa) após doses cumulativas completas, sem evidências histológicas de lesão miocárdica (Gillings et al., 2009).

Bristow, Lopez, Mason, Billingham, & Winchester, 1982, demonstraram que a biópsia, apesar de invasiva, pode diminuir a morbidade e a mortalidade, associadas à ocorrência de insuficiência cardíaca, em pacientes tratados com doxorubicina. Mesmo que os pacientes desenvolvam insuficiência cardíaca, a detecção precoce de alterações no miocárdio, permite interromper a administração do quimioterápico, quando os sinais são ainda ligeiros e transitórios. Segundo os autores, pacientes que não foram monitorizados apresentaram sintomas mais severos e uma maior taxa de mortalidade, quando foi detetada a insuficiência cardíaca.

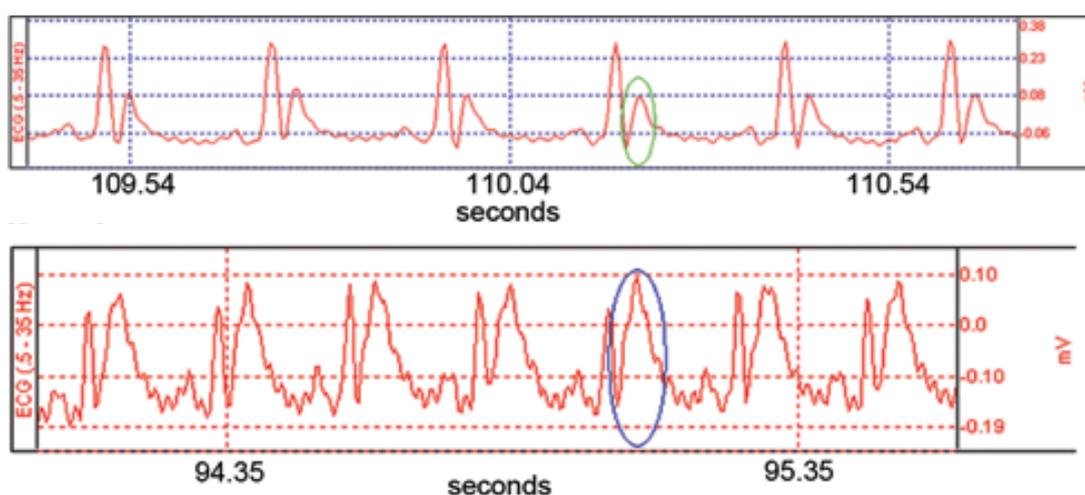
Apesar da sua eficácia, a biópsia do miocárdio raramente é utilizada na prática clínica oncológica, por ser considerada por muitos clínicos, uma técnica de elevado risco, para além de ser necessário bastante treino e experiência para a sua execução (Chatterjee et al., 2010; Octavia et al., 2012; Ratterree et al., 2012).

### **1.6.8.3. Eletrocardiografia**

A eletrocardiografia é uma técnica simples, bastante utilizada na prática clínica e relativamente útil na identificação de sinais de cardiotoxicidade aguda, sobretudo. Em medicina veterinária, a incidência de alterações eletrocardiográficas, observadas após a administração de doxorubicina, corresponde a um intervalo de 12–17.7% (Pereira Neto et al., 2006).

As alterações ecocardiográficas mais frequentemente associadas à cardiotoxicidade da doxorubicina incluem variações na amplitude da onda R, variações no segmento ST ou na onda T, taquicardia sinusal, arritmias ventriculares (complexos ventriculares prematuros) e arritmias supraventriculares (complexos atriais prematuros e fibrilhação atrial) (Mauldin et al., 1992; Pereira Neto et al., 2006; Ratterree et al., 2012; Smith Jr. et al., 2008). A figura 6 ilustra o ECG de um grupo de ratos (B), previamente tratados com doxorubicina, onde se observa uma alteração da conformação normal do traçado eletrocardiográfico. A elevação do segmento ST (círculo azul) é a alteração mais evidente, observando-se, ainda, um aumento da duração da onda P, do QRS e do intervalo R-R, bem como uma redução dos ciclos cardíacos. Na mesma imagem pode ver-se o ECG de um grupo de ratos, do mesmo estudo, que não foi submetido a qualquer tratamento (A). O círculo verde indica um segmento ST normal.

Algumas destas variações podem ser assintomáticas ou surgir acompanhadas de ligeiros sintomas (Octavia et al., 2012). Certas arritmias podem resultar numa diminuição do débito cardíaco, síncope ou mesmo morte súbita (Pereira Neto et al., 2006). Banco et al., (2011), descreveram um caso clínico de fibrilhação atrial, seguida de morte súbita, num cão submetido a um protocolo de seis semanas com doxorrubicina e ciclofosfamida, após esplenectomia de hemangiossarcoma. Na necrópsia foi identificada uma dilatação ventricular bilateral e edema pulmonar e a análise histopatológica (figura 5) revelou degeneração vacuolar dos cardiomiócitos.



**Figura 6** – Alterações eletrocardiográficas associadas à cardiotoxicidade da doxorrubicina: traçados eletrocardiográficos de dois grupos de ratos: A – normais, sem qualquer tratamento; B – após tratamento com doxorrubicina. (Adaptado de Momin, Kalai, Shikalgar, & Naikwade, 2012).

Um único caso de variação no eixo elétrico, secundariamente a alterações no QRS, foi descrito num cão, por Pereira Neto et al., (2006). Neste estudo, a alteração mais frequente foi uma diminuição na amplitude da onda R, a qual pode ser indicativa de fibrose do miocárdio e perda de massa muscular cardíaca, contudo, torna-se impossível associar os resultados do ECG a possíveis alterações provocadas pela doxorrubicina, sem uma biópsia e exame histológico do miocárdio. Um aumento na duração da onda P foi também descrito e sugere uma dilatação do átrio direito, contudo, tal não foi confirmado por ecocardiografia (Pereira Neto et al., 2006).

#### 1.6.8.4. Holter

Por vezes, podem surgir arritmias transitórias que escapam ao exame

eletrocardiográfico normal. Em caso de suspeita das mesmas, ou apenas com o objetivo de obter uma avaliação mais contínua do sistema cardiovascular, pode ser realizado um exame Holter. Este consiste numa eletrocardiografia ambulatoria, que grava os batimentos cardíacos por um longo período de tempo, normalmente, durante 24 horas. É o teste não invasivo mais sensível na detecção precoce de arritmias transitórias, que poderiam passar despercebidas num ECG em repouso e que podem estar associadas a alterações induzidas pela doxorubicina (Pereira Neto et al., 2006).

#### **1.6.8.5. Radiografia torácica**

A radiografia constitui mais um método de monitorização de cardiotoxicidade. Apesar de não possibilitar uma avaliação dinâmica da função cardíaca, este exame permite uma visualização da vasculatura pulmonar e do tamanho e forma do coração (Selting et al., 2004). Evidências de cardiomegalia, edema pulmonar, efusão pleural, hepatomegalia e ascite podem ser sinais de cardiomiopatia dilatada e ICC (Smith Jr. et al., 2008).

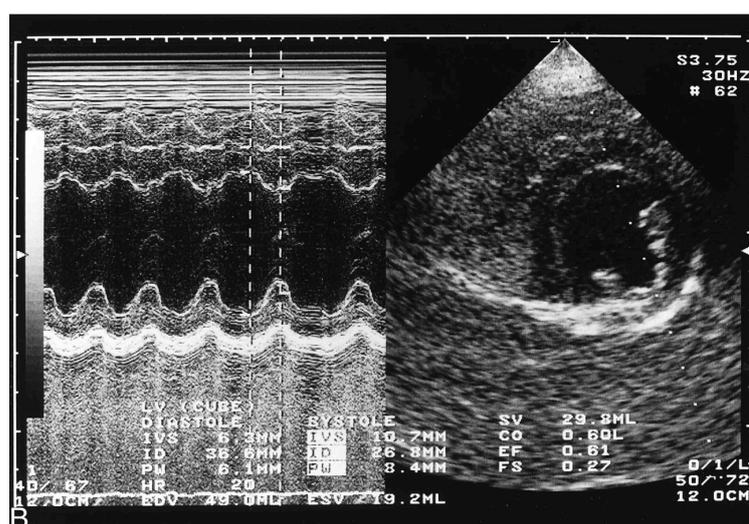
#### **1.6.8.6. Ecocardiografia**

A ecocardiografia, juntamente com o ECG, é o método mais utilizado na monitorização da cardiomiopatia induzida pela doxorubicina, uma vez que ambos são exames não invasivos, bastante acessíveis e económicos (Ratterree et al., 2012). A ecocardiografia é considerada por muitos autores o teste mais sensível na avaliação da função sistólica, embora a sua variabilidade e limitações devam ser tidas em conta (Gillings et al., 2009). Apesar de possibilitar uma visão do estado geral do sistema cardiovascular, este exame não permite prever se e quando é que os pacientes vão desenvolver uma cardiomiopatia ao longo do seu tratamento quimioterápico (Ratterree et al., 2012).

A cardiomiopatia dilatada é a principal manifestação de cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina (Boon, J., 2011a; Mauldin et al., 1992; Monnet & Orton, 1999; Silva & Camacho, 2005). A perda progressiva de miofibrilhas, provocada pela ação tóxica da doxorubicina no coração, contribui para a ocorrência da dilatação ventricular observada na CMD, acompanhada por um aumento do stress da parede das câmaras e incapacidade de contração e de relaxamento. Todos estes fatores podem culminar no desenvolvimento de ICC (Shi et al., 2011). A figura 7 mostra a progressão da insuficiência cardíaca, traduzida pela

redução significativa da contractilidade do ventrículo esquerdo e uma dilatação do mesmo. A CMD, associada à cardiotoxicidade da doxorubicina, tende a ser progressiva e refratária ao tratamento, podendo levar ao desenvolvimento de ICC mesmo após descontinuação ou término do protocolo quimioterápico (Alves de Souza & Camacho, 2006; Gillings et al., 2009).

A ecocardiografia é particularmente útil na detecção e monitorização da disfunção sistólica, característica da CMD e relatada em casos de cardiotoxicidade (Boon, J., 2011a; Mauldin et al., 1992; Monnet & Orton, 1999; Silva & Camacho, 2005).



**Figura 7** – Ecocardiografia: dilatação do ventrículo esquerdo e diminuição da contractilidade miocárdica. (Adaptado de Toyoda et al., 1998).

Uma alteração da função sistólica do miocárdio pode ocorrer nos primeiros dias após a administração de doxorubicina, através de sinais ligeiros e reversíveis. Numa fase inicial, geralmente, não são notórias manifestações clínicas evidentes, no entanto, após doses cumulativas da antraciclina, a disfunção sistólica tende a agravar-se, tornando-se irreversível (Boon, J., 2011a; Chatterjee et al., 2010; Sawyer et al., 1999). A disfunção sistólica é caracterizada por uma incapacidade de bombeamento do coração, acompanhada por um decréscimo na fração de ejeção (Boon, J., 2011b).

A fração de encurtamento (FS) é o parâmetro mais utilizado na avaliação da função sistólica (Boon, J., 2011b; Fuentes, 2008), permitindo quantificar a função contrátil do ventrículo esquerdo (Bulwer et al., 2007). Os valores de referência da FS, em cães, correspondem a um intervalo de 25% a 45%, embora animais sem doença cardíaca poderão apresentar valores inferiores a 25% (Fuentes, 2008). A FS reflete a mudança percentual na

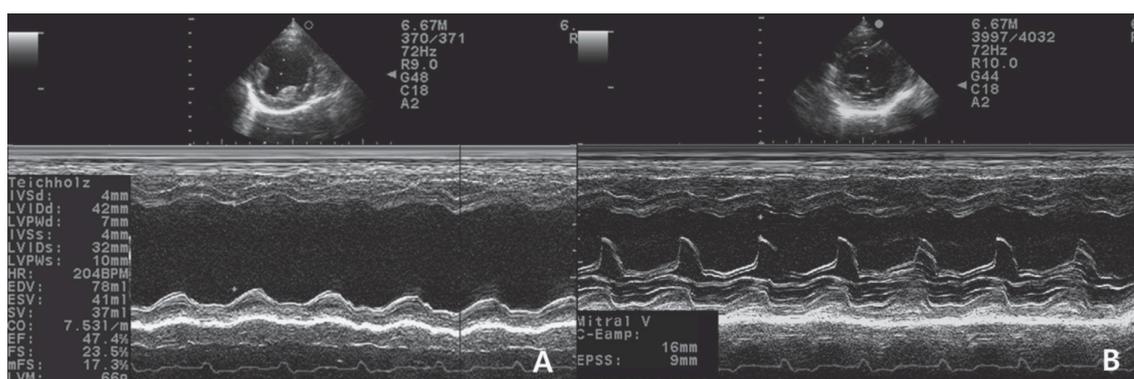
dimensão do ventrículo esquerdo, entre as fases de sístole e diástole e pode ser avaliada em modo M, num eixo curto, ao nível das cordas tendíneas e dos músculos papilares, através da medição do diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole (DVE<sub>d</sub>) e do diâmetro interno do ventrículo esquerdo em sístole (DVE<sub>s</sub>), através da seguinte equação:  $[FS = (DVE_d - DVE_s) / DVE_d]$  (Smith Jr. et al., 2008; Tater et al., 2012).

A redução da FS é uma das alterações mais frequentemente descritas em estudos sobre a cardiotoxicidade associada à doxorubicina em animais (Alves de Souza & Camacho, 2006; Gillings et al., 2009; Hanai et al., 1996; Ratterree et al., 2012), bem como o aumento das dimensões do ventrículo esquerdo (Alves de Souza & Camacho, 2006; Monnet & Orton, 1999; Toyoda et al., 1998). Por vezes, pode verificar-se a redução da espessura da parede livre do ventrículo esquerdo e do septo ventricular (Monnet & Orton, 1999; Silva & Camacho, 2005; Toyoda et al., 1998), embora este último seja mais afetado nos humanos (Boon, J., 2011a). Na figura 8 observa-se um aumento do diâmetro ventricular, associado a uma diminuição da contractilidade do ventrículo.

Alguns autores consideram que a FS consiste no parâmetro ecocardiográfico mais eficaz na monitorização da cardiotoxicidade, podendo ser utilizado para quantificar o grau de disfunção sistólica (Alves de Souza & Camacho, 2006; Gillings et al., 2009). Outros discordam desta teoria (Migrino et al., 2008; Tater et al., 2012). Tater et al., (2012), não encontraram alterações significativas na fração de encurtamento, em cães com linfoma, ao longo de um protocolo combinado com doxorubicina, demonstrando que este parâmetro poderá não ser suficientemente sensível na deteção de alterações precoces da função sistólica, ou que o protocolo utilizado não provocou uma disfunção sistólica nos animais. De facto, apesar da FS ser bastante utilizada na quantificação da função sistólica, ela apresenta algumas limitações, tornando a sua interpretação pouco específica. Este índice de função ventricular é afetado, não só pela contractilidade do miocárdio, mas também pela pré-carga e pela pós-carga, sendo que a sua redução poderá ser secundária a uma alteração em qualquer um desses fatores (Boon, J., 2011b; Fuentes, 2008; Tater et al., 2012).

Outro achado ecocardiográfico relatado em casos de cardiotoxicidade associada à doxorubicina é o aumento da distância do ponto E do folheto anterior da válvula mitral ao septo interventricular, também observado na figura 8 (Boon, J., 2011a; Hanai et al., 1996; Mauldin et al., 1992; Monnet & Orton, 1999; Ratterree et al., 2012). Este parâmetro, medido no Modo M, é um indicador da função e enchimento ventriculares e o seu aumento está, normalmente, associado a um decréscimo na fração de ejeção (Boon, J., 2011b). À medida

que progridem os sinais de insuficiência miocárdica pode denotar-se, simultaneamente, um déficit na função diastólica, com consequente variação do rácio da onda E pela onda A (E/A) do fluxo transmitral, o qual pode ser avaliado por Doppler (Hanai et al., 1996; Monnet & Orton, 1999). Este rácio reflete o gradiente de pressão que atravessa a válvula mitral e o seu valor deve ser superior a 1. (Boon, J., 2011b). Uma inversão do rácio ( $E/A < 1$ ) representa uma falha no relaxamento ventricular, que corresponde a um grau ligeiro de disfunção diastólica, caracterizada por um fluxo com padrão não restritivo. Se o rácio for superior a 2, o padrão é restritivo e indica uma disfunção diastólica grave (Ho, 2007).



**Figura 8** – Ecocardiografia: aumento do DVEs e do DVED, diminuição da contractilidade (A) e aumento da EPSS (B). (Adaptado de Lee et al., 2015).

A ocorrência de regurgitação mitral (FitzPatrick et al., 2010; Hanai et al., 1996; Ratterree et al., 2012) e triscúspide, a dilatação do átrio esquerdo (FitzPatrick et al., 2010; Ratterree et al., 2012) e o aumento do tempo de relaxamento isovolumétrico (Monnet & Orton, 1999) (tempo decorrido desde o fim da ejeção ventricular até à abertura da válvula mitral e início do enchimento diastólico ventricular) (Boon, J., 2011a) são, também, indicadores de disfunção diastólica, relatados em casos de cardiotoxicidade da doxorubicina.

No Homem, o parâmetro mais utilizado na monitorização da cardiotoxicidade da doxorubicina é a fração de ejeção (FE) do ventrículo esquerdo (Mauldin et al., 1992; Tan & Scherrer-Crosbie, 2012). Em medicina humana, um valor de FE inferior ou igual a 30% é indicativo de interrupção do tratamento com doxorubicina (Ratterree et al., 2012; Takemura & Fujiwara, 2007), sendo que o seu valor de referência é superior a 55%. No cão, a fração de ejeção apresenta valores de referência entre 50% e 65% (Smith Jr. et al., 2008), no entanto, em medicina veterinária os critérios de descontinuação da doxorubicina não estão objetivamente definidos, sendo dever do clínico estudar essa decisão, com base nos efeitos

adversos demonstrados pelo paciente (Gillings et al., 2009; Ratterree et al., 2012).

A FE consiste na percentagem de sangue ejetado pelo ventrículo esquerdo em cada batimento. Para calcular o seu valor é necessário determinar o volume ventricular na sístole e na diástole cardíacas. A fórmula mais utilizada na determinação de volumes, e recomendada pela *American Society of Echocardiography* (ASE), é a regra de *Simpson* modificada (ou método biplanar de discos). Este método oferece a melhor correlação com o volume real do ventrículo esquerdo, uma vez que, ao invés de assumir uma geometria predeterminada, permite definir o contorno ventricular através de um delineamento manual dos bordos que delimitam a cavidade desta câmara cardíaca. Desta forma, a mesma é convertida num conjunto de discos elípticos, pelo *software* do ecógrafo, que irão permitir o cálculo automático do volume ventricular. Para aplicar o método de *Simpson* modificado deverá realizar-se o delineamento dos bordos ventriculares numa vista apical de duas ou quatro câmaras (Boon, J., 2011b; Bulwer et al., 2007). Os volumes ventriculares podem ser divididos pela ASC, de forma a obter-se o índice do volume do ventrículo esquerdo em telesístole (IVVEs) e o índice do volume do ventrículo esquerdo em telediástole (IVVED):  $IVVEs = VVEs / ASC$ ;  $IVVED = VVED / ASC$ .

#### **1.6.8.7. Biomarcadores Cardíacos**

Os biomarcadores são moléculas biológicas, que podem ser quantificadas e utilizadas como sinais ou indicadores de processos biológicos e patológicos ou de respostas terapêuticas. Os biomarcadores podem ser utilizados como ferramentas de diagnóstico (por exemplo, níveis elevados de glicose para diagnóstico de Diabetes mellitus) e monitorização de doenças, permitindo, ainda, classificar o seu grau de severidade, para além de possibilitarem uma previsão do prognóstico e da resposta a uma determinada terapêutica (Atkinson A. et al., 2001). Este trabalho irá focar-se nos principais biomarcadores cardíacos, troponinas e péptidos natriuréticos.

##### **1.6.8.7.1. Troponinas**

As troponinas consistem em proteínas reguladoras, compostas por três subunidades que, juntas, participam na regulação da contração dos miócitos do tecido muscular estriado. A troponina cardíaca T (cTnT) forma um complexo com a tropomiosina, o qual se liga à actina.

As restantes subunidades, troponina I (cTnI) e troponina C (cTnC) são responsáveis pela inibição e estimulação da contração cardíaca, mediada pelo cálcio e ATP. Apesar de as troponinas estarem presentes nos tecidos cardíaco e esquelético, elas são codificadas por diferentes genes, resultando em isoformas específicas para cada tecido, com diferentes sequências de aminoácidos. As isoformas da troponina C são completamente homólogas, tornando-a impossível de ser utilizada como um biomarcador cardíaco. A troponina T apresenta mais de 50% de homologia entre as suas isoformas, embora elas possam ser identificadas separadamente. Já as isoformas da troponina I apresentam menos de 50% de homologia, sendo que, durante processos patológicos, ela não é expressa no músculo esquelético, tornando-se unicamente cardíaca. Estas características permitiram o desenvolvimento de ensaios quantitativos, baseados em anticorpos monoclonais, específicos para as isoformas cardíacas da cTnI e da cTnT (Langhorn & Willesen, 2016; Sparano et al., 2002).

Uma vez que as troponinas são proteínas intracelulares, a sua presença em circulação sugere uma libertação de conteúdo celular. Acredita-se que esta possa ocorrer por morte celular e fenómenos irreversíveis (necrose, apoptose ou *turnover* celular), ou através de processos que não comprometem a viabilidade dos cardiomiócitos (permeabilidade aumentada, proteólise intracelular, formação de vesículas). Normalmente, quando há morte celular ocorre libertação da troponina citosólica livre e da estrutural (a que está acoplada ao complexo contráctil celular), mas na ausência de morte celular apenas a primeira é libertada (Smith Jr. et al., 2008). Durante uma lesão cardíaca, a troponina I é libertada em concentrações superiores à troponina T, embora uma maior concentração das duas, em circulação, sugira uma lesão miocárdica mais significativa e necrose celular (Langhorn & Willesen, 2016; Oyama & Sisson, 2004). Este aumento pode ser detetado 2 a 3 horas após a lesão, atingindo um pico após 18 a 24 horas (Smith Jr. et al., 2008).

Várias causas podem levar ao aumento das troponinas, nomeadamente, causas cardíacas (isquémia, necrose, arritmias, enfarte do miocárdio, degeneração miocárdica, ICC, estenose subaórtica, estenose pulmonar, doença mixomatosa da válvula mitral, CMD, cardiomiopatia arritmogénica do ventrículo direito nos Boxers, miocardite, dirofilariose, efusão pericárdica, hemangiossarcoma cardíaco) e não cardíacas (trauma, sépsis, inflamação sistémica, outras neoplasias, hipotensão, hemoparasitas, dilatação gástrica e volvus, insuficiência renal) (Langhorn & Willesen, 2016; Smith Jr. et al., 2008; Wells & Sleeper, 2008).

Oyama & Sisson, (2004), num estudo com cães, demonstraram haver uma relação entre a idade e a concentração plasmática de cTnI. À medida que o coração envelhece perde cerca de 35% dos miócitos, seja por causas degenerativas ou outras associadas. Os autores acreditam que a presença de cTnI em circulação em cães mais velhos poderia dever-se à morte de alguns cardiomiócitos ou ao *turnover* celular, ambos consequência do processo de envelhecimento.

As troponinas são os biomarcadores cardíacos mais específicos na detecção de lesão miocárdica (Atas et al., 2015), sobretudo a cTnI, devido à sua alta especificidade e sensibilidade na previsão de disfunção ventricular e respetiva severidade (Atas et al., 2015). A cTnI é considerada um bom marcador para a cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina, uma vez que esta está associada à morte das células miocárdicas (Atas et al., 2015; Langhorn & Willesen, 2016; Selting et al., 2004; Smith Jr. et al., 2008). Cardinale et al., (2000), demonstraram que um aumento nas concentrações séricas de cTnI permite prever a ocorrência de disfunção ventricular, em pessoas submetidas a um protocolo com doxorrubicina em doses altas. O mesmo foi demonstrado em cães, tratados com doxorrubicina, que desenvolveram sinais de cardiotoxicidade (Selting et al., 2004). Neste estudo, aumentos das troponinas foram detetados previamente à manifestação de alterações clínicas, em cães (32/44) com evidências de disfunção cardíaca, confirmada posteriormente por ecocardiografia. Segundo os autores, a medição dos níveis de cTnI deve ser realizada até 24 horas após a administração de doxorrubicina, uma vez que, após 48 horas estes voltaram ao normal (Selting et al., 2004). É, igualmente, recomendado que sejam realizadas medições seriadas de troponina, em vez de uma única medição (Smith Jr. et al., 2008). Atas et al., (2015), descreveram um aumento nos níveis séricos de cTnI em dois grupos de ratos tratados com doses altas e baixas de doxorrubicina, respetivamente. Este biomarcador demonstrou grande sensibilidade na detecção de sinais de cardiotoxicidade, revelando-se mais eficaz do que os péptidos natriuréticos, também avaliados no mesmo estudo.

A concentração média normal de cTnI, em cães, varia entre <0,03-0,07 ng/mL, enquanto que nos gatos o intervalo é de <0,03-0,16 (Wells & Sleeper, 2008). Geralmente, a concentração de troponinas na doença cardíaca primária tende a estar apenas ligeiramente aumentada (<1 ng/mL), raramente ultrapassando valores de 1-2 ng/mL em casos de ICC severa (Langhorn & Willesen, 2016). Um aumento das troponinas cardíacas pode ser notório após uma única administração de doxorrubicina (Sawyer et al., 1999).

### 1.6.8.7.2. Péptidos Natriuréticos

Os péptidos natriuréticos consistem num grupo de hormonas capazes de controlar a homeostase dos fluidos corporais, através das suas propriedades natriuréticas e diuréticas, para além de exercerem um influência no sistema renina-angiotensina-aldosterona. Existem vários tipos de péptidos natriuréticos, no entanto, o péptido natriurético atrial (ANP) e o péptido natriurético cerebral (BNP) são os mais relevantes neste trabalho, por serem os únicos associados a patologias cardíacas nos pequenos animais (Baisan et al., 2014).

Estas hormonas cardíacas são secretadas em resposta a uma sobrecarga atrial ou ventricular. O ANP é libertado pelos átrios e o BNP pelos átrios e ventrículos, mas principalmente pelos últimos (Baisan et al., 2014; Hayakawa et al., 2001). As concentrações de ambas as hormonas aumentam na ICC, contudo, o BNP apresenta sensibilidade e especificidade superiores na deteção de disfunção ventricular esquerda (Hayakawa et al., 2001). O BNP é libertado sob a forma de uma prohormona (proBNP), a qual sofre uma clivagem, originando o fragmento N-terminal da prohormona BNP (NT-proBNP) e BNP. A última consiste na porção ativa do BNP e as suas funções incluem, predominantemente, vasodilatação, natriurese e diurese. O NT-proBNP é uma molécula inativa, utilizada primariamente em medicina humana, no diagnóstico da ICC, deteção de patologia oculta e tratamento e prognóstico de doença cardíaca (Baisan et al., 2014; DeFrancesco, 2011; Sparano et al., 2002).

Os níveis plasmáticos de BNP aumentam rapidamente (em cerca de quatro horas) em resposta a uma distensão da parede ventricular, provocada por um sobrecarga aguda de volume ou de pressão nestas câmaras cardíacas (Atas et al., 2015; Lee, H. S. et al., 2008; Sparano et al., 2002). Um aumento da concentração sérica de BNP está fortemente correlacionado com o aumento da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo, bem como com a pressão capilar pulmonar, em pacientes com insuficiência cardíaca (Oyama & Sisson, 2004), permitindo que este biomarcador seja útil no diagnóstico e prognóstico desta patologia (Atas et al., 2015; Lee, H. S. et al., 2008). Estudos (Oyama et al., 2009; Prosek et al., 2007) em cães demonstraram, ainda, a eficácia do BNP e do NT-proBNP na diferenciação de dispneia de origem cardíaca, devido a ICC, e dispneia de origem não cardíaca. Uma concentração superior do péptido natriurético foi detetada nos cães que apresentavam doença de origem cardíaca (Oyama et al., 2009; Prosek et al., 2007). Um estudo com crianças demonstrou que medições de ANP e BNP durante o tratamento com doxorrubicina permitem

detetar pacientes em risco de desenvolverem alterações cardíacas graves, sugerindo que os níveis plasmáticos destas hormonas poderiam ser biomarcadores da cardiotoxicidade associada à doxorrubicina (Hayakawa et al., 2001). Outro estudo, já referido anteriormente neste trabalho, comparou os níveis de cTnI, BNP e endotelina-1 (ET-1) em ratos tratados com doses altas e baixas de doxorrubicina. Os resultados demonstraram um aumento nas concentrações séricas de cTnI, nos dois grupos de animais, enquanto os níveis de BNP e de ET-1 apenas aumentaram no grupo submetido a doses altas. Ambos os grupos apresentavam alterações cardíacas histológicas, compatíveis com cardiotoxicidade. Os autores sugeriram que a cTnI seria um marcador mais sensível na deteção de sinais precoces de cardiotoxicidade secundária à doxorrubicina, correlacionando-se com a presença de alterações histológicas (Atas et al., 2015).

Na espécie canina, uma concentração inferior a 900  $\mu\text{mol/l}$  não sugere uma distensão do miocárdio e stress da parede, à exceção da raça Doberman Pinscher, na qual, uma concentração superior a 735  $\mu\text{mol/l}$  é indicativa de risco acrescido de CMD (Baisan et al., 2014).

#### **1.6.8.8. Outros métodos de diagnóstico**

Para além destes testes convencionais, outros métodos são utilizados no diagnóstico da cardiotoxicidade associada à doxorrubicina. A fração de ejeção e outros parâmetros da função sistólica podem ser avaliados através do exame ecocardiográfico padrão, no entanto, nem sempre é possível obter imagens de boa qualidade, de forma a poder realizar-se corretas medições. A angiocardiografia e a ventriculografia de radionuclídeos são exames não invasivos e bastante sensíveis, capazes de complementar a ecocardiografia. A angiocardiografia é um método bastante utilizado na monitorização da cardiotoxicidade associada à doxorrubicina, em medicina humana, devido à sua alta reprodutibilidade na medição da FE e na sua capacidade de reduzir a incidência de ICC (Jiji et al., 2012; Lu, 2005; Ratterree et al., 2012). Nenhum destes exames é realizado rotineiramente em medicina veterinária (Gillings et al., 2009; Ratterree et al., 2012).

Outro método não invasivo e altamente sensível, utilizado na deteção precoce de cardiotoxicidade, consiste num teste com anticorpos monoclonais anti-miosina marcados com Índio-111. Os anticorpos são capazes de detetar, precocemente, miócitos danificados ou morte celular. Após serem captados pelo miocárdio, ligam-se às cadeias pesadas de miosina

intracelular expostas, indicativas de lesões agudas nas células musculares cardíacas (Chatterjee et al., 2010; Ganz et al., 1996; Lu, 2005). Este método é também utilizado no diagnóstico de miocardite (Chatterjee et al., 2010). A sua sensibilidade no diagnóstico de cardiomiopatia secundária à doxorubicina é bastante elevada, no entanto, a baixa especificidade e o tempo despendido nestes testes, são fatores que condicionam a sua utilização (Lu, 2005). A ressonância magnética cardíaca é outro teste que permite avaliar a função sistólica do ventrículo esquerdo, apesar de não apresentar especificidade para a cardiomiopatia induzida pela doxorubicina (Chatterjee et al., 2010). Recentemente, têm vindo a ser estudados novos parâmetros ecocardiográficos, nomeadamente, a deformação miocárdica, capaz de detetar precocemente uma disfunção do miocárdio, mesmo na ausência de alterações na FE, permitindo prever uma possível disfunção do ventrículo esquerdo e posterior progressão para cardiomiopatia (Wickramasinghe et al., 2016). Os índices de deformação miocárdica são avaliados por ecocardiografia *strain* (deformação) bidimensional (bidimensional strain echocardiography, 2DSE). Este método é baseado no Doppler tecidual e permite realizar medições da deformação do miocárdio, através de uma técnica de rastreamento de pontos (*speckle-tracking*), em imagens captadas no modo B (Migrino et al., 2008). Estudos em medicina humana e veterinária demonstraram que a 2DSE parece ter uma maior sensibilidade relativamente à ecocardiografia convencional (Mitry & Edwards, 2016). Migrino et al., (2008), demonstraram que o estudo do *strain* radial global, avaliado por 2DSE, foi capaz de detetar precocemente sinais de disfunção miocárdica, associada a cardiomiopatia secundária ao tratamento com doxorubicina. A diminuição do *strain* radial acompanhou alterações histológicas compatíveis com cardiotoxicidade.

### **1.6.9. Prevenção**

Várias medidas podem ser adotadas com vista à prevenção da cardiotoxicidade associada à doxorubicina. Para além das técnicas de monitorização que já foram abordadas, a maioria dos métodos utilizados para diminuir ou prevenir as lesões miocárdicas incluem alternativas farmacológicas à doxorubicina, administração de agentes cardioprotetores ou alterações no plano de tratamento.

#### **1.6.9.1. Agentes quimioterápicos alternativos**

A substituição da doxorubicina por outros agentes antineoplásicos, como a epirrubicina ou a mitoxantrona, pode ser uma alternativa em pacientes que não toleram os efeitos adversos da doxorubicina, ou quando a sua dose cumulativa total é alcançada (Alderton et al., 1992; FitzPatrick et al., 2010; Mauldin et al., 1992; Wang, S. et al., 2016). A mitoxantrona é um derivado sintético das antraciclina, com ação semelhante à doxorubicina, contudo, apresenta menor potencial cardiotoxico em pessoas e animais (Alderton et al., 1992; Wang, S. et al., 2016). Quando utilizada como agente único no tratamento do linfoma, a mitoxantrona demonstra atividade terapêutica e baixa toxicidade (Wang, S. et al., 2016). Alderton, Gross, & Green, (1992), compararam a toxicidade da doxorubicina com a epirrubicina e a mitoxantrona, em ratos, e demonstraram que as duas últimas são menos cardiotoxicas, particularmente, a epirrubicina.

### **1.6.9.2. Antioxidantes**

Vários estudos têm abordado a incorporação de substâncias antioxidantes em tratamentos com doxorubicina, na tentativa de reduzir os danos oxidativos nas células cardíacas (Bjelogrljic et al., 2005; Myers et al., 1977; Vincent et al., 2013). Myers et al., (1977), sugeriram que a suplementação com vitamina E seria capaz de reduzir a toxicidade cardíaca provocada pela doxorubicina, reduzindo, assim, o risco de ICC. A vitamina E é capaz de atenuar a severidade da cardiotoxicidade aguda, quando administrada em doses seriadas, previamente ao tratamento com doxorubicina (Wang, Y. et al., 1980), no entanto, o mesmo não ocorre com uma única administração de vitamina E (Bjelogrljic et al., 2005). Quanto às alterações associadas à cardiotoxicidade crônica da doxorubicina, o efeito protetor da vitamina E já não se verifica (Breed et al., 1980; Vleet et al., 1979). Kumar et al., (1999), demonstraram que o trolox, um análogo da vitamina E, seria capaz de diminuir a ocorrência de apoptose celular após a administração de doxorubicina.

O carvedilol, um antagonista dos recetores adrenérgicos, com propriedades antioxidantes, é utilizado no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva e o seu efeito protetor contra a cardiotoxicidade da doxorubicina também já foi demonstrado (Chatterjee et al., 2010; Matsui et al., 1999; Mitry & Edwards, 2016; Oliveira et al., 2004; Vincent et al., 2013). Conforme descrito em estudos de medicina humana, para além do seu poder antioxidante, o carvedilol parece ser eficaz contra a desregulação do cálcio intracelular provocado pela doxorubicina, para além de reduzir as evidências histológicas de

cardiomiopatia e as alterações na fração de ejeção, quando administrado em combinação com a antraciclina (Mitry & Edwards, 2016). Estudos em animais também demonstraram o seu efeito cardioprotetor contra a cardiomiopatia induzida pela doxorubicina (Matsui et al., 1999; Oliveira et al., 2004).

Continuando a abordagem da prevenção farmacológica antioxidante, destaca-se, ainda, o dexrazoxano. Este fármaco já foi mencionado previamente nesta dissertação, relativamente ao seu efeito protetor no extravasamento de doxorubicina. A sua capacidade de diminuir o stress oxidativo e estimular a expressão de enzimas antioxidantes permitiu-lhe o reconhecimento, em medicina humana, como um dos agentes cardioprotetores mais eficazes na prevenção da cardiotoxicidade, quando combinado com a doxorubicina. Ainda assim, alguns estudos relataram uma diminuição no efeito antineoplásico da doxorubicina, quando combinada com este fármaco (Mitry & Edwards, 2016). Os resultados do estudo de Kotamraju et al., (2000), contrariaram a teoria subjacente ao efeito cardioprotetor do dexrazoxano, demonstrando que este não foi capaz de inibir a apoptose celular provocada pela doxorubicina. Num estudo de Herman & Ferrans, (1998) apud Matsui et al., (1999), o dexrazoxano revelou ser o agente mais cardioprotetor em vários modelos animais de cardiomiopatia induzida pela doxorubicina. Um estudo mais recente demonstrou que a administração de dexrazoxano, em combinação com doxorubicina, foi segura e bem tolerada por animais com hemangiossarcoma, no entanto, não foi possível recolher ilações acerca do seu efeito cardioprotetor (FitzPatrick et al., 2010).

### **1.6.9.3. Doxorubicina encapsulada em lipossomas**

Formas alternativas de libertação de fármacos foram desenvolvidas na tentativa de alcançar uma resposta terapêutica desejável, obter uma libertação controlada e diminuir a toxicidade de quimioterápicos. Um exemplo, consiste na doxorubicina encapsulada em lipossomas (Teske et al., 2011). Os lipossomas apenas abandonam o sistema vascular em zonas comprometidas pelo crescimento tumoral ou em órgãos rodeados por barreiras endoteliais fenestradas, tornando-se menos provável o seu acesso ao coração, uma vez que, no miocárdio predominam capilares com junções de oclusão (*tight junctions*) (Mitry & Edwards, 2016; Rahman et al., 2007). Evidências clínicas demonstram que a doxorubicina encapsulada em lipossomas pode ser utilizada em substituição das antraciclina convencionais, reduzindo a sua cardiotoxicidade sem afetar a resposta antitumoral (Lee, Y. et al., 2015; Rahman et al.,

2007). A eficácia deste método foi demonstrada em humanos, cães e ratos (Harris et al., 2002; Herman et al., 1983; Kanter et al., 1993). A administração de doxorubicina através de lipossomas peguilados é igualmente eficaz na redução da cardiotoxicidade, de acordo com um estudo em cães e coelhos (Working et al., 1999). A peguilação consiste no revestimento dos lipossomas com uma camada de polietilenoglicol, que os protege do sistema fagocítico mononuclear, permitindo que permaneçam em circulação durante mais tempo (Rahman et al., 2007; Teske et al., 2011). Teske et al., (2011), não encontraram nenhuma diferença na eficácia dos lipossomas peguilados, relativamente à doxorubicina livre, como terapia adjuvante em cães com hemangiossarcoma esplênico. Nenhum animal de ambos os grupos demonstrou sinais de cardiotoxicidade e os tempos de sobrevivência foram semelhantes em todos os cães.

#### **1.6.9.4. Método de administração**

Outra medida e, talvez, a mais eficaz, consiste na alteração do método de administração da doxorubicina. Estudos demonstraram que uma menor dose de doxorubicina administrada semanalmente, ao invés de três em três semanas, além de uma infusão contínua lenta e constante, permitem diminuir as lesões iniciais da cardiotoxicidade, não comprometendo a eficácia terapêutica da antraciclina (Octavia et al., 2012; Torti et al., 1986; Wickramasinghe et al., 2016). Von Hoff et al. (1979), apud Gillings et al. (2009), relataram uma diminuição na incidência de ICC em pessoas que receberam administrações semanais de doxorubicina. O mesmo não se verificou em cães com diagnóstico de linfoma, aos quais foram administrados  $10 \text{ mg/m}^2$  semanais de doxorubicina, com taxas de remissão que ficaram aquém do esperado (Ogilvie, Vail, Klein, Powers, & Dickinson, 1991, apud Gillings et al., 2009). Em medicina humana foi demonstrado que uma infusão prolongada de doxorubicina, durante horas ou dias, poderia diminuir o pico de concentração plasmática da antraciclina, o qual está diretamente associado com as formas aguda e crônica de cardiotoxicidade, permitindo, assim, diminuir a sua ocorrência (Gillings et al., 2009; Mauldin et al., 1992). O aumento do tempo de infusão irá aumentar, ainda, a AUC, melhorando a eficácia quimioterápica. A aplicabilidade desta medida em medicina veterinária apresenta algumas limitações, nomeadamente, a disponibilidade de técnicos ou a oposição dos proprietários a hospitalizações prolongadas. No entanto, um estudo com cães concluiu que, mesmo um pequeno prolongamento do tempo de infusão da doxorubicina, em uma a três

horas, poderá reduzir significativamente a incidência de cardiotoxicidade (Gillings et al., 2009).

## **2. Objetivos**

Esta dissertação de mestrado, teve por base um estudo-piloto, cujo objetivo principal consistiu em avaliar a incidência de cardiotoxicidade associada à doxorubicina, em cães, num hospital de referência na área da oncologia (HVB, Hospital Veterinário Berna).

Foi, ainda, objetivo secundário deste trabalho, implementar um plano de acompanhamento mais constante da função cardíaca de cada paciente, antes, durante e após o tratamento, através de exames ecocardiográficos e de biomarcadores cardíacos, avaliando a sua eficácia na monitorização e deteção precoce de toxicidade cardíaca.

## **3. Material e Métodos**

### **3.1. Critérios de seleção**

Para a realização deste estudo foram selecionados todos os canídeos, no HVB, que cumprissem os seguintes critérios:

- diagnóstico de neoplasia (independentemente da origem);
- instituição de quimioterapia com doxorrubicina;
- Ausência de doença cardíaca ou com doença cardíaca, classificados até ao estadio B2 do sistema de classificação ACVIM (*American College of Veterinary Internal Medicine*), inclusive;
- Sobreviverem ou suportarem todos os estádios de controlo.

A inclusão de cada paciente no estudo, bem como, todos os procedimentos envolventes do mesmo, foram realizados após consentimento informado dos proprietários.

### **3.2. Critérios de interrupção**

A participação de cada paciente no estudo seria interrompida no caso de surgir a impossibilidade de realizar os exames ecocardiográficos por falta de colaboração do animal e/ou do proprietário ou no caso de ocorrer uma interrupção do protocolo de quimioterapia com doxorrubicina antes do seu término, por:

- morte do animal; alteração de protocolo, com substituição da doxorrubicina por outro(s) quimioterápico(s).

### **3.3. Caracterização dos protocolos quimioterápicos e dos controlos do estudo**

Os animais incluídos no estudo foram tratados com doxorrubicina através do protocolo combinado CHOP ou de um protocolo de agente único. No HVB é utilizado o protocolo CHOP de 19 semanas, o qual inclui um total de quatro administrações de doxorrubicina, divididas numa administração semanal, realizada de cinco em cinco semanas, entre a quarta e a décima nona semana (tabela 10). Quando a doxorrubicina é administrada como agente único, o número de administrações é semelhante, no entanto, o intervalo de

tempo entre cada administração é de três semanas, perfazendo um total de dez semanas (tabela 11).

Para avaliação da alteração de parâmetros ecocardiográficos e de biomarcadores cardíacos foram apreciados 11 parâmetros, durante 5 estádios de administração de doxorubicina (pré ou T0, após primeira administração ou T1, após segunda administração ou T2, após terceira administração ou T3 e após o término da quimioterapia ou T4) em canídeos com diagnóstico de neoplasia. Todos os estádios, com a exceção do estádio T0, coincidiram com a semana seguinte a cada administração de doxorubicina. Nas tabelas 10 e 11 é possível observar a calendarização de cada controlo, ao longo dos protocolos.

### **3.4. Avaliação ecocardiográfica**

A avaliação dos parâmetros cardíacos ecocardiográficos foi sempre executada pelo mesmo operador, com o ecógrafo MyLab™ Seven<sup>3</sup> do Hospital Veterinário Berna. Todas as ecocardiografias foram executadas sem recurso a sedação ou anestesia. Após tricotomia da região pré-cordial, em ambos os lados do tórax, os animais foram colocados em decúbito lateral direito e posteriormente em decúbito lateral esquerdo.

Inicialmente, a imagem ecocardiográfica foi focada no plano paraesternal direito longitudinal de quatro câmaras, começando por se fazer uma avaliação geral subjetiva das câmaras cardíacas, batimento cardíaco e ecogeneidade do coração. Ainda neste plano, e de forma a poder avaliar-se a função sistólica do ventrículo esquerdo, procedeu-se à medição de vários parâmetros, em modo-M, nomeadamente, as dimensões internas do ventrículo esquerdo em sístole e em diástole, a espessura do septo interventricular e da parede livre do ventrículo esquerdo, em sístole e em diástole, bem como a fração de encurtamento. No modo bidimensional (2D) foi feita a medição dos volumes sistólico e diastólico do ventrículo esquerdo, através do Método de *Simpson* modificado, os quais permitiram o cálculo automático da fração de ejeção, do IVVEs e do IVVEd.

Posteriormente, num plano paraesternal direito longitudinal de cinco câmaras, continuando numa imagem 2D, observou-se o trato de saída do ventrículo esquerdo, bem como a aorta e a válvula aórtica. Rodando-se a sonda para um plano transversal, mediu-se o

---

<sup>3</sup> Esaote SpA – Itália

diâmetro da aorta, em diástole, e do átrio esquerdo, em sístole, e o cálculo do rácio do átrio esquerdo pela aorta foi feito automaticamente pelo ecógrafo. De seguida, o exame continuou no plano paraesternal direito transversal, em todos os seus níveis, onde se avaliou a base do coração, ambos os ventrículos, os músculos papilares, válvulas mitral, pulmonar e aórtica.

Já com os pacientes em decúbito lateral esquerdo, procedeu-se à avaliação do enchimento ventricular, através de medições da velocidade da onda E e da onda A, bem como à avaliação da função diastólica, pelo fluxo transmitral (rácio E/A), com o Doppler espectral pulsátil no plano paraesternal esquerdo apical de quatro câmaras.

Para objeto de estudo, foram incluídos os parâmetros indicados na tabela 1: fração de encurtamento (FS), diâmetro do ventrículo esquerdo em sístole (DVEs), diâmetro do ventrículo esquerdo em diástole (DVEd), fração de ejeção (FE), rácio E/A do fluxo transmitral, rácio do átrio esquerdo pela aorta (AE/Ao), diâmetro do átrio esquerdo (AE), volume do ventrículo esquerdo em telesístole (VVEs) e volume do ventrículo esquerdo em telediástole (VVEd). Para posterior discussão de resultados foram incluídos mais dois parâmetros: índice do volume do ventrículo esquerdo em telesístole (IVVEs) e índice do volume do ventrículo esquerdo em telediástole (IVVEd), uma vez que não foram encontrados intervalos de referência para VVEs e VVEd. Estes índices traduzem a divisão dos volumes ventriculares pela ASC de cada animal. Os valores de referência considerados para cada parâmetro estão incluídos nos Anexos.

**Tabela 1** – Parâmetros ecocardiográficos avaliados.

Modo M	Modo B	Doppler
FS (%)	VVEs (mm)	
	VVEd (mm)	
DVEs (mm)	FE (%)	E/A
DVEd (mm)	AE/Ao	

### **3.4.1. Determinação da concentração plasmática de Biomarcadores Cardíacos**

Para a colheita de sangue desinfectou-se a pele com álcool etílico a 70%, com o

animal em decúbito lateral, procedendo-se, de seguida, à venipuntura da veia cefálica. Em situações em que esta não estava acessível foi utilizada a veia jugular, com os animais sentados. Recolheram-se cerca de 2 mililitro (mL) de sangue. Desta quantidade, 1 mL foi colocado num tubo com EDTA, para a medição do pro-BNP, e o sangue restante foi colocado num tubo seco, para posterior medição da troponina I. Após centrifugação do sangue, a 1500 rotações por minuto, durante 5 minutos, na centrífuga<sup>4</sup> do HVB, o soro (tubo seco) e o plasma (tubo com EDTA) obtidos foram transferidos para tubos *Eppendorf* (mínimo 0,5 mL), devidamente identificados (nome do paciente, tipo de tubo, data). Posteriormente, estes foram congelados e enviados para o laboratório INNO<sup>5</sup>, localizado em Braga, para processamento das amostras e medição dos biomarcadores.

### **3.5. Análise Estatística**

Para efeitos de avaliação estatística dos parâmetros ecográficos e de biomarcadores recorreu-se ao software SPSS - IBM (c) versão 20 e ao Microsoft Excel. Foram calculadas medidas de tendência central como a média, mediana e medidas de dispersão como o desvio padrão. Adicionalmente, foram elaborados gráficos para avaliação dos estádios de administração de doxorubicina. Devido ao constrangimento associado às perdas de seguimento, não foi possível obter um tamanho de amostra suficiente para fazer estatística inferencial.

---

<sup>4</sup> PrO-Vet – Centurion Scientific Ltd

<sup>5</sup> Inno - Serviços Especializados em Veterinária, Lda – Braga

## 4. Resultados

### 4.1. Classificação da amostra

Para este estudo, foram recrutados, prospectivamente, nove canídeos com diagnóstico de neoplasia e com indicação de um plano terapêutico de quimioterapia com doxorrubicina, no HVB. Estes cães eram de diferentes raças, nomeadamente, Labrador (1/9), *Cairn Terrier* (1/9), Pastor Alemão (1/9), *Caniche* (1/9), *Boxer* (1/9), *Pit Bull* (2/9) e SRD (Sem Raça Definida) (2/9), dos quais, 5 eram fêmeas e 4 eram machos. As suas idades situavam-se entre os 8 e os 16 anos (média de 13 anos) e os mesmos pesavam entre 8,6 Kg e 37,5 Kg (média de 23,3 Kg). O linfoma foi a neoplasia mais frequentemente diagnosticada (7 em 9 cães). As restantes neoplasias diagnosticadas incluíram dois adenocarcinomas e um hemangiossarcoma, sendo que, uma cadela apresentava, simultaneamente, linfoma e carcinoma. Todos os cães tinham indicação terapêutica de protocolo CHOP (19 semanas), à exceção de duas cadelas, que iriam ser tratadas com um protocolo de agente único com doxorrubicina. Destes nove animais, apenas três preencheram os critérios de inclusão do estudo e foram utilizados na análise estatística.

### 4.2. Parâmetros Ecocardiográficos

Num dos animais (C1), uma cadela SRD com 12 anos, foi detetado um sopro cardíaco sistólico de grau III/VI (segundo a escala de Levine, 1933), no estágio T0. A ecocardiografia revelou uma regurgitação ligeira da válvula mitral, condicionada por um espessamento irregular do bordo oclusivo do seu folheto anterior/septal. No mesmo controlo ecocardiográfico (T0) foi detetado um aumento do IVVEd (74,3 mL/m<sup>2</sup>), de acordo com o intervalo de referência considerado (figura 14). Denotou-se, ainda, um aumento do diâmetro do AE, com um valor médio de 36,6 mm (35,8 – 37,3 mm), considerando o intervalo de referência para o seu peso (figura 12). Em medicina veterinária, o método mais utilizado para quantificar o diâmetro do AE é o rácio AE/Ao (Wesselowski et al., 2014). Apesar de se ter verificado um aumento do diâmetro do AE na paciente em questão, os valores do rácio AE/Ao estiveram compreendidos entre 1.51 e 1.56 (média de 1.53), não ultrapassando os limites de referência, da figura 13 (0.86–1.59). Nos estádios T3 e T4 verificou-se uma ligeira diminuição do rácio E/A do fluxo transmitral (1.13 e 1.09, respetivamente), de acordo com o

intervalo de referência da figura 15 (1.18 - 1.89).

Outro animal (C2), uma cadela da raça Labrador com 12 anos, foi diagnosticado com hemangiossarcoma e tratado com doxorrubicina, segundo um protocolo de agente único, juntamente com imunoterapia com células dendríticas. Os exames ecocardiográficos não demonstraram alterações das funções sistólica e diastólica. Todos os parâmetros ecocardiográficos avaliados estavam dentro dos limites referenciados para a sua raça (figura 11), com exceção do rácio E/A. No estágio T0, este apresentou um valor ligeiramente abaixo do limite inferior do intervalo de referência considerado, contudo, com todos os outros parâmetros normais, a sua alteração foi considerada fisiológica.

O último cão (C3) incluído no estudo era um Cairn Terrier, macho com 14 anos e diagnosticado com linfoma, tendo sido tratado com um protocolo CHOP. No primeiro estágio (T0) este paciente foi diagnosticado com DMVM. Durante o exame físico auscultou-se um sopro sistólico de grau III/VI, mais audível no hemitórax esquerdo. Na ecocardiografia, a válvula mitral apresentava um espessamento irregular no bordo oclusivo do folheto anterior, não coaptando corretamente, o que condicionou uma regurgitação severa. Uma dilatação atrial esquerda, evidente na ecocardiografia, traduziu-se num aumento do rácio AE/Ao, o qual apresentou um valor médio de 1.99 (1.78 – 2.08). O valor do diâmetro do átrio esquerdo ultrapassou o limite superior do intervalo de referência, apenas, nos estádios T1, T2 e T3, apresentando uma média de 25,22 mm (22,4 – 26,4 mm), no entanto, o rácio AE/Ao esteve aumentado em todos os estádios. O fluxo transmitral revelou uma inversão do rácio E/A, o qual foi progressivamente diminuindo ao longo de todo o tratamento, de 0.88 a 0.80 (média de 0.84), sugerindo um estadió inicial de disfunção diastólica. A história clínica deste cão, a nível cardiovascular, incluía episódios de síncope (por vezes, precedidos de engasgos), tosse não produtiva e dificuldade respiratória. Foi realizado um exame Holter para despistar arritmias devido a distúrbios de condução ou ritmo, que poderiam estar na causa das síncope (Abbott, 2000), porém o exame revelou-se normal. Paralelamente aos sinais de DMVM, este animal demonstrou uma dispneia expiratória durante o exame físico, com presença de sons respiratórios anormais (crepitações) à auscultação, sugerindo doença do trato respiratório inferior. Foi realizada uma radiografia, que revelou um padrão pulmonar brônquico e intersticial, marcados e difusos. Os diagnósticos diferenciais considerados foram fibrose pulmonar idiopática (frequente nas raças *Terrier*) (Cohn, 2010), doença pulmonar obstrutiva crónica e hipertensão pulmonar (HP). No entanto, as câmaras cardíacas estavam normodimensionadas e a válvula tricúspide apresentava, apenas, uma regurgitação ligeira,

com um velocidade de 2,5 m/s, não sendo sugestivo de HP.

No último estágio (T4) houve uma alteração significativa de todos os parâmetros ecocardiográficos (exceto a FE), em virtude de um agravamento e descompensação de HP. Durante a consulta denotou-se a presença de ascite e distensão abdominal, edema periférico nos membros e respectivas extremidades frias, hipotermia (35,9°C) e um aumento da intensidade do sopro cardíaco, que englobava o hemitórax direito. Os proprietários referiram uma intolerância súbita ao exercício. Realizou-se uma ecografia abdominal, na qual foi diagnosticada uma ligeira efusão peritoneal e congestão hepática. A ecocardiografia revelou uma FS de 52%, tendo em conta o intervalo de valores normais para o seu peso (figura 9), bem como, uma redução do DVEs (6,9 mm), DVEd (14,2 mm), IVVEs (3,5 mL/m<sup>2</sup>) e IVVEd (12,1 mL/m<sup>2</sup>), abaixo dos respetivos limites inferiores de referência. A pressão sistólica da artéria pulmonar (PAP) (90,6 mmHg) foi calculada através da avaliação do jato regurgitante da válvula tricúspide. Para isso, utilizou-se a equação de Bernoulli modificada [ $GRT = 4 \cdot (VRT)^2$ ], para calcular o gradiente de pressão de regurgitação da tricúspide (GRT) (75,9 mmHg), através da velocidade do seu fluxo regurgitante (VRT) (4,36 m/s) (Kellihan, H. B. & Stepien, 2010). O valor da pressão no ventrículo direito é determinado pela soma do GRT com o valor da pressão no átrio direito (15,0 mmHg), o qual, em condições fisiológicas tende a ser cerca de 5 mmHg (Boon, J., 2011c), no entanto, neste animal, o átrio e o ventrículo direitos apresentavam uma hipertrofia e dilatação exuberantes. Na ausência de obstrução no trato de saída do ventrículo direito, a PAP é igual à pressão no ventrículo direito (VD), durante a sístole. Na ecocardiografia foi, ainda, diagnosticada uma dilatação da artéria e válvula pulmonares e prolapso desta última.

### **4.3. Biomarcadores Cardíacos**

No canídeo C1, a cTnI apresentou valores entre 0.36 e 1.39 ng/mL (média de 0.83 ng/mL), os quais aumentaram gradualmente ao longo do tratamento, ultrapassando a partir do estágio T3 o limite superior do intervalo de referência adaptado pelo laboratório INNO (0.0 - 0.7 ng/mL). O pro-BNP variou de 356 a 508 pmol/L, apresentando uma média de 441 pmol/L. Durante o tratamento houve uma grande variação dos seus valores, no entanto, estes mantiveram-se sempre abaixo de 900 pmol/L. Este valor é considerado, pelo laboratório INNO, o limiar, abaixo do qual, existe uma baixa probabilidade dos sintomas clínicos se deverem a insuficiência cardíaca. A cadela C2 apresentou valores de cTnI entre

0.17 e 1.43 ng/mL (média de 0.84 ng/mL). Similarmente à cadela C1, estes valores aumentaram ao longo do tratamento, ultrapassando o limite superior do intervalo de referência a partir do estágio T3. O pro-BNP variou entre 637 e 1380 pmol/L (média de 979) e apenas nos estádios T1 e T2 estes valores ultrapassaram os 900 pmol/L. Segundo o laboratório INNO, valores de pro-BNP no intervalo 900 – 1800 pmol/L não permitem a diferenciação entre sintomas clínicos devido a insuficiência cardíaca ou outras causas. O paciente C3 obteve valores de cTnI entre 0.10 e 0.79 ng/mL (média de 0.36 ng/mL) e este biomarcador apenas ultrapassou o limite de referência no último estágio (T4). O pro-BNP apresentou valores de 293 a 2330 pmol/L (média de 792 pmol/L), os quais se mantiveram relativamente constantes durante todos os controlos e abaixo de 900 pmol/L, sofrendo uma subida exponencial no controlo T4.

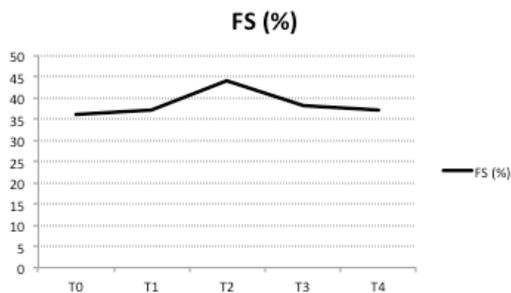
#### **4.4. Análise estatística das variáveis**

Os parâmetros que se seguem são apresentados mediante os controlos efetuados durante os cinco estádios: pré-administração, primeira administração, após segunda administração, após terceira administração e após o término da quimioterapia.

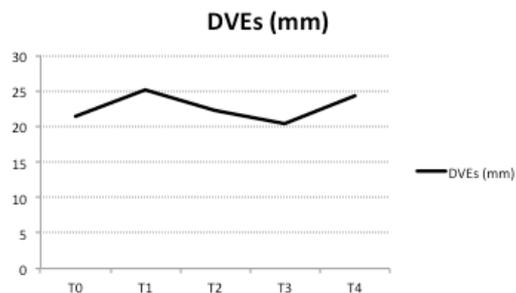
As tabelas que se seguem exibem a média e mediana. A mediana, dado o número reduzido de medições, parece ser um indicador mais real do que a média, uma vez que esta é mais suscetível a valores extremos. Os dados apresentados, devido aos constrangimentos do tamanho da amostra, devem ser apreciados de forma indicativa e não conclusiva.

##### **4.4.1. Parâmetros da Ecocardiografia em modo-M**

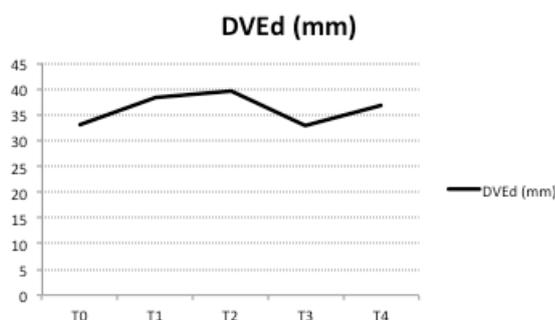
A evolução dos valores medianos da FS, DVEs e DVEd são apresentados nos gráficos 5 a 7, que se seguem:



**Gráfico 5** – Valores medianos da fração de encurtamento (FS) referentes aos 3 canídeos, nos cinco estádios (T0 a T4).



**Gráfico 6** – Valores medianos do diâmetro do ventrículo esquerdo em sístole (DVEs) referentes aos 3 canídeos, nos cinco estádios (T0 a T4).



**Gráfico 7** – Valores medianos do diâmetro do ventrículo esquerdo em diástole (DVEd) referentes aos 3 canídeos, nos cinco estádios (T0 a T4).

Constata-se que, percentualmente, a FS diminui após o estádio T2. Em relação aos parâmetros dos diâmetros verifica-se que há um aumento inicial da dimensão, que seguidamente diminui até à terceira, e última, administração, voltando a subir após o final da quimioterapia.

As tabelas 2 e 3, que se seguem, exibem a média e mediana.

**Tabela 2** – Valores médios e desvio padrão dos parâmetros do modo-M dos 3 canídeos, nos cinco estádios (T0 a T4).

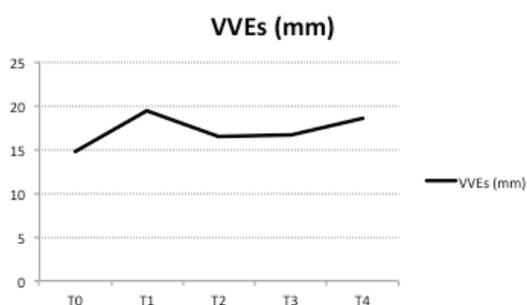
	Tempo	FS (%)	s	DVEs (mm)	s	DVEd (mm)	s
Controlos	T0	36	11,31	21,5	9,05	33	8,34
	T1	38	6,56	22	6,17	35,23	6,93
	T2	39,67	7,51	21,77	5,72	35,93	6,7
	T3	37,5	0,71	20,4	5,8	32,9	9,76
	T4	41	9,64	19,3	10,79	31,03	14,84

**Tabela 3** – Valores medianos dos parâmetros do modo-M dos 3 canídeos, nos cinco estádios (T0 a T4).

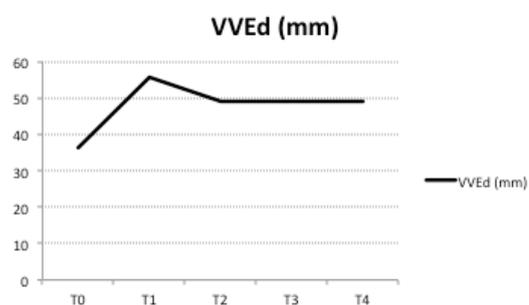
	Tempo	FS (%)	DVEs (mm)	DVEd (mm)
Controlos	T0	36	21,5	33
	T1	37	25,1	38,3
	T2	44	22,3	39,5
	T3	38	20,4	32,9
	T4	37	24,4	36,7

#### 4.4.2. Parâmetros da Ecocardiografia Bidimensional

A evolução dos valores medianos do VVEs e VVEd, do rácio AE/Ao, da medição do AE e da FE são apresentados nos gráficos 8, 9, 10, 11 e 12, respetivamente:

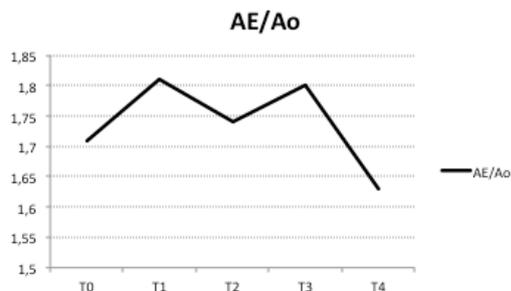


**Gráfico 8** – Valores medianos do volume do ventrículo esquerdo em sístole (VVEs) referentes aos cinco estádios (T0 a T4) dos três canídeos.

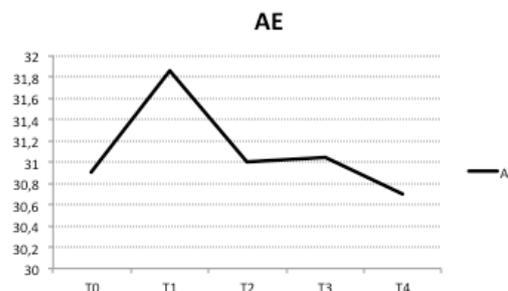


**Gráfico 9** – Valores medianos do volume do ventrículo esquerdo em diástole (VVEd) referentes aos cinco estádios (T0 a T4) dos três canídeos.

Em relação aos volumes, os valores medianos decrescem após a primeira administração, mantendo-se estáveis ao longo das administrações sucessivas.

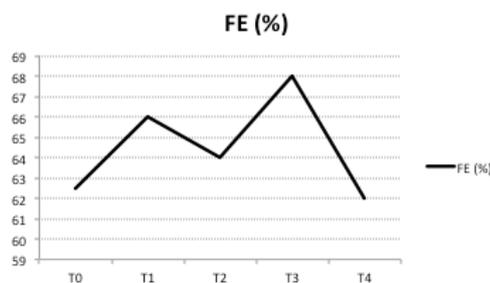


**Gráfico 10** – Valores medianos do rácio átrio esquerdo pela aorta (AE/Ao) referentes aos cinco estádios (T0 a T4) dos três canídeos.



**Gráfico 11** – Valores medianos do diâmetro do átrio esquerdo (AE) referentes aos cinco estádios (T0 a T4) dos três canídeos.

Os valores medianos do AE e do rácio AE/Ao atingem o pico de valores mais elevados na primeira administração decrescendo sucessivamente no caso do AE ao longo das administrações. O rácio, porém, parece flutuar, verificando-se uma elevação dos valores medianos na última administração.



**Gráfico 12** – Valores medianos da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FE), pelo método de *Simpson* modificado, referentes aos cinco estádios (T0 a T4) dos três canídeos.

À exceção da segunda administração, a percentagem da FE aumenta até à terceira administração, quando atinge o pico, decrescendo abruptamente após o término do tratamento para o nível de valores do estágio pré-tratamento.

As tabelas 4 e 5 exibem a média, a mediana e os respetivos desvio padrão destes parâmetros.

**Tabela 4** – Valores médios e desvio padrão dos parâmetros do modo 2D dos 3 canídeos, nos cinco estádios (T0 a T4).

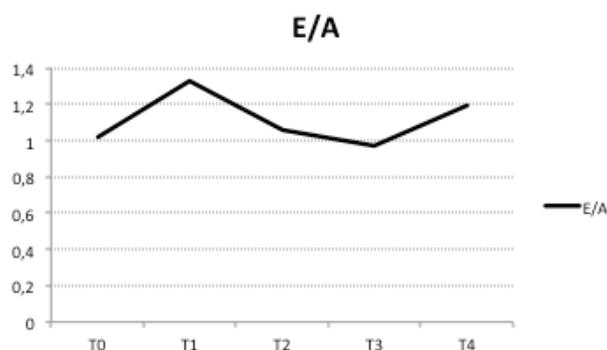
	Tempo	VVEs (mm)	s	VVEd (mm)	s	FE (%)	s	AE/Ao	s	AE	s
Controlos	T0	14,75	13,93	36,35	30,33	62,50	6,36	1,71	0,33	30,90	8,91
	T1	15,87	10,53	42,47	24,77	64,67	7,09	1,81	0,35	31,85	7,71
	T2	15,57	10,03	41,13	24,11	62,67	4,16	1,74	0,48	31,00	6,51
	T3	16,60		49,10		68,00	2,83	1,80	0,40	31,05	6,72
	T4	15,03	12,25	37,63	28,85	63,33	7,09	1,63	0,21	30,70	11,74

**Tabela 5** – Valores medianos dos parâmetros do modo 2D dos 3 canídeos, nos cinco estádios (T0 a T4).

	Tempo	VVEs (mm)	VVEd (mm)	FE (%)	AE/Ao	AE
Controlos	T0	14,75	36,35	62,5	1,71	30,9
	T1	19,5	55,6	66	1,81	31,85
	T2	16,5	48,9	64	1,74	31
	T3	16,6	49,1	68	1,8	31,05
	T4	18,6	49,2	62	1,63	30,7

#### 4.4.3. Parâmetro da Ecocardiografia Doppler

A evolução dos valores medianos, do rácio E/A do fluxo transmitral, é apresentada no gráfico 13, que se segue:



**Gráfico 13** – Valores medianos do rácio da onda E pela onda A (E/A) referentes aos cinco estádios (T0 a T4) dos três canídeos.

Após o aumento inicial verificado na primeira administração de doxorubicina, constata-se uma diminuição progressiva até à terceira medição, verificando-se após término desta, última administração, uma subida dos valores medianos.

As tabelas que se seguem exibem a média, desvio padrão (tabela 6) e mediana (tabela 7).

**Tabela 6** – Valores médios e desvio padrão do rácio E/A dos 3 canídeos, nos cinco estádios (T0 a T4).

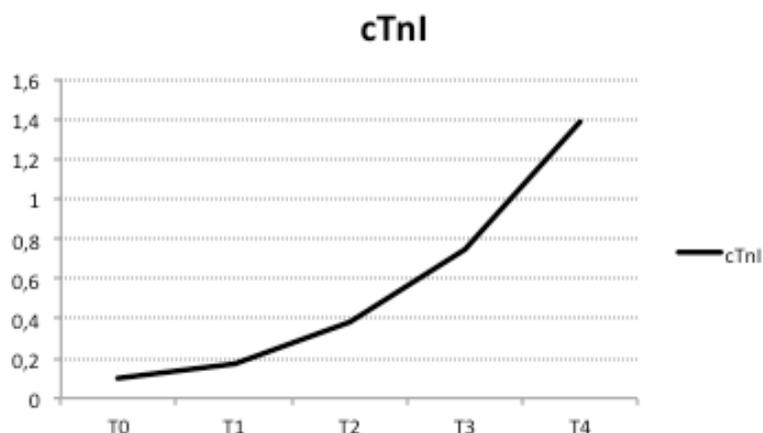
	Tempo	E/A	s
Controlos	T0	1,02	0,20
	T1	1,33	-
	T2	1,06	0,32
	T3	0,97	0,23
	T4	1,19	0,14

**Tabela 7** – Valores medianos do rácio E/A dos 3 canídeos, nos cinco estádios (T0 a T4).

	Tempo	E/A
Controlos	T0	1,02
	T1	1,33
	T2	1,06
	T3	0,97
	T4	1,19

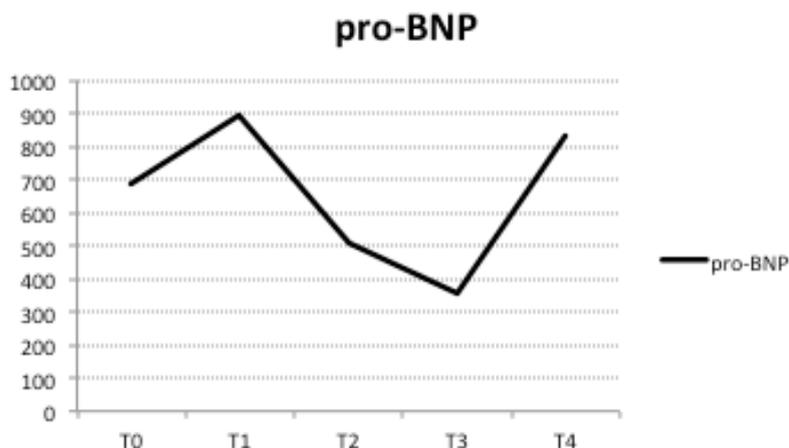
#### 4.4.4. Biomarcadores

A evolução dos valores medianos de cTnI (gráfico 14) e pro-BNP (gráfico 15) são apresentados nos gráficos que se seguem:



**Gráfico 14** – Valores medianos da cTnI dos 3 canídeos, nos cinco estádios (T0 a T4).

Dos parâmetros avaliados, a cTnI apresenta um aumento consistente ao longo de todos os estádios, inclusivamente, após o término da administração de doxorrubicina.



**Gráfico 15** – Valores medianos do pro-BNP dos 3 canídeos, nos cinco estádios (T0 a T4).

Ao contrário da cTnI, o biomarcador pro-BNP diminui desde a primeira administração até à última, subindo após esta para valores ligeiramente mais elevados que o estádio de pré-tratamento.

As tabelas 8 e 9, que se seguem, exibem a média, mediana e desvio padrão destes biomarcadores.

**Tabela 8** – Valores médios e desvio padrão dos biomarcadores cardíacos dos 3 canídeos, nos cinco estádios (T0 a T4).

	Tempo	cTnl	s	pro-BNP	s
Controlos	T0	0,10	-	689,00	295,57
	T1	0,17	0,00	897,00	683,77
	T2	0,43	0,10	701,00	390,45
	T3	0,79	0,43	429,00	183,15
	T4	1,20	0,36	1206,00	990,46

**Tabela 9** – valores medianos dos biomarcadores cardíacos dos 3 canídeos, nos cinco estádios (T0 a T4).

	Tempo	cTnl	pro-BNP
Controlos	T0	0,1	689
	T1	0,17	897
	T2	0,38	508
	T3	0,75	356
	T4	1,39	829

## 5. Discussão de Resultados

Segundo a literatura, a FS e a FE são os parâmetros ecocardiográficos mais frequentemente alterados em casos de cardiotoxicidade secundária à administração de doxorubicina. A diminuição destes índices é sugestiva de uma diminuição da função sistólica, um dos primeiros sinais de cardiomiopatia dilatada, associada a cardiotoxicidade. No presente estudo, estes parâmetros, bem como as dimensões internas do ventrículo esquerdo, permaneceram dentro dos padrões da normalidade, considerando os respetivos limites de referência. Numa perspetiva generalista verifica-se uma ligeira redução da FS a partir do estádio T2, nos gráficos das medianas. A FE, apesar de apresentar uma maior oscilação, também acaba por diminuir no final do tratamento. Relativamente às dimensões do ventrículo esquerdo verificou-se um aumento dos seus diâmetros nos estádios finais. Estas variações são semelhantes àquelas descritas em casos de cardiotoxicidade secundária à doxorubicina, no entanto, há que ter em consideração que estes valores são influenciados pelas variações individuais de cada canídeo e que, de uma forma geral, estes parâmetros mantiveram-se dentro dos respetivos intervalos de referência. É igualmente importante referir que um dos canídeos (C3) demonstrou uma alteração marcada nos valores dos seus parâmetros ecocardiográficos, no estádio T4, o que poderá também ter influenciado a curva dos valores medianos gerais. O rácio AE/Ao e o diâmetro do AE foram os parâmetros ecocardiográficos que sofreram mais alterações, individualmente, uma vez que, dois dos canídeos (C1 e C3), apresentavam DMVM, com conseqüente dilatação do AE.

No início do tratamento, estes pacientes apresentavam um sopro sistólico, acompanhado por uma regurgitação mitral, identificada à ecocardiografia. De acordo com

Côté et al., 2015, a regurgitação mitral é a principal causa de sopros sistólicos com ponto de máxima intensidade (PMI) no hemitórax esquerdo, na zona do ápex cardíaco, tal como se verificou nestes dois casos. A DMVM é o principal diagnóstico diferencial a ser considerado, num cão adulto, com estes achados clínicos. Esta é uma doença degenerativa crónica, que resulta num espessamento e numa aposição incompleta dos folhetos da válvula mitral, durante a sístole, com conseqüente regurgitação, podendo mesmo ocorrer protrusão da válvula (Chetboul, Valérie & Tissier, 2012). Outras causas de regurgitação mitral incluem CMD, endocardite infecciosa e displasia congénita da válvula mitral (Côté et al., 2015). Uma regurgitação mitral significativa e crónica resulta numa sobrecarga de volume, a qual, se traduz, primariamente, numa dilatação do AE. (Chetboul, Valérie & Tissier, 2012). Apesar de a cadela C1 ter demonstrado, apenas, uma regurgitação mitral ligeira, a ecocardiografia revelou uma leve dilatação do AE. Paralelamente, foi medido o rácio AE/Ao, de modo a obter uma informação mais precisa da dimensão atrial esquerda. Na paciente em questão, os valores deste índice mantiveram-se dentro do intervalo de referência da figura 13, contudo, alguns autores consideram que um rácio AE/Ao superior a 1.5 é representativo de uma dilatação do AE (Borgarelli, M. et al., 2012; Haggstrom et al., 2008; Wesselowski et al., 2014). Segundo Borgarelli et al., (2012), um rácio de 1.4 já sugere uma dilatação leve do AE, representando um risco significativo de morte cardíaca, em pacientes com DMVM. Tal como o grau de dilatação atrial, o aumento do IVVEd constitui outro indicador de severidade da regurgitação mitral (Chetboul, V. et al., 2009), podendo refletir uma dilatação ventricular, em resposta ao contínuo aumento da sobrecarga de volume (Chetboul, Valérie & Tissier, 2012). No primeiro estágio verificou-se um aumento do IVVEd, no entanto, nos restantes controlos, esta variável manteve-se dentro dos parâmetros da normalidade, pelo que a alteração não foi considerada significativa. Nos estádios T3 e T4 verificou-se uma ligeira diminuição do rácio E/A do fluxo transmitral, mantendo-se com valores entre 1 e 2, contudo, este parâmetro pode ser influenciado por alguns fatores, como a idade ou a frequência cardíaca (Borgarelli, Michele et al., 2006; Schober & Fuentes, 2001). Esta paciente foi classificada, segundo a gravidade da sua doença cardíaca, com um estadio B2, de acordo com a classificação proposta pelo ACVIM. Os animais pertencentes a este estadio são assintomáticos, no entanto, apresentam regurgitação mitral hemodinamicamente significativa, com evidências ecocardiográficas de remodelagem cardíaca, nomeadamente, dilatação do átrio esquerdo ( $AE > 1.5$ ) (Haggstrom et al., 2008), ventrículo esquerdo ou ambos (Atkins et al., 2009).

O canídeo C3 apresentou uma regurgitação mitral mais grave e uma dilatação

evidente do átrio esquerdo. Em todos os controlos, a ecocardiografia demonstrou um aumento do rácio AE/Ao, com uma média de valores de 1.99, refletindo uma regurgitação mais severa, face ao canídeo C1. Durante todo o tratamento, o animal C3 manteve-se estável, no entanto, no estágio T4 houve uma alteração súbita do seu estado clínico, por desenvolvimento e descompensação de uma hipertensão pulmonar severa (VRT e GRT elevados, dilatação da artéria pulmonar, dilatação e prolapso da válvula pulmonar, dilatação e hipertrofia exuberantes do átrio e ventrículo direitos, intolerância súbita ao exercício). A função diastólica, avaliada pelo rácio E/A, apresentou uma diminuição gradual, traduzida por uma inversão da superioridade da onda E face à onda A, nos cinco controlos, sugerindo uma diminuição da capacidade de enchimento. Esta já poderia estar comprometida inicialmente, devido ao curso da DMVM, tendo sido agravada com a HP. A HP pode ser definida como uma pressão sistólica da artéria pulmonar superior a 30 mm/Hg, aproximadamente (Kellihan, H. B. & Stepien, 2010). Uma VRT superior a 4,3 m/s e um GRT superior a 75 mm/Hg sugerem uma HP severa (Kellihan & Stepien, 2010) e irreversível, sendo que, o risco de morte aumenta quando o gradiente é superior a 50 mm/Hg (Borgarelli, M. et al., 2015), como foi observado neste animal. A HP é uma complicação frequente em cães com DMVM. Doenças pulmonares primárias, como a fibrose pulmonar, ou doença pulmonar obstrutiva crónica, também afetam raças caninas de pequeno porte com DMVM, podendo, igualmente, contribuir para o desenvolvimento da HP (Borgarelli, M. et al., 2015; Kellihan, H., 2010). Este cão apresentava uma história de síncope, tosse e engasgos, o que, juntamente com um padrão pulmonar brônquico e intersticial exuberante, sugere algum grau de doença pulmonar. Apesar de o paciente C3 não ter apresentado evidências clínicas de HP antes do estágio T4, vários fatores podem ter contribuído para o seu desenvolvimento e agravamento, nomeadamente, os sinais de doença pulmonar respiratória, a DMVM com remodelagem cardíaca marcada, a disfunção diastólica, a quimioterapia com um agente cardiotoxico e, possivelmente, algum grau de ICC esquerda. Face à progressão da HP, a capacidade de compensação do ventrículo direito (por dilatação e hipertrofia) torna-se insuficiente, desenvolvendo-se ICC direita. Este canídeo demonstrou sinais de ICC direita (ascite, distensão abdominal, congestão hepática e edema periférico nos membros) (Tilley, Larry & Smith, 2008a) na altura do estágio T4, sugerindo que foi, provavelmente, esse o curso que a sua doença cardíaca levou. Simultaneamente, este cão apresentava-se hipotérmico e com as extremidades dos membros frias, ao toque. Considerando toda a lista de problemas e patologias pré-existentes, o principal diagnóstico diferencial foi tromboembolismo pulmonar.

Este consiste na deposição de um coágulo sanguíneo na artéria pulmonar, formando um trombo que bloqueia o fluxo sanguíneo (Tilley, Larry & Smith, 2008b). Geralmente, o tromboembolismo precede a HP, constituindo uma das suas possíveis causas, devido ao potencial de provocar disfunção endotelial e/ou remodelagem vascular da artéria pulmonar, redução do seu lúmen e aumento da resistência vascular pulmonar (Kellihan, H., 2010). A obstrução da artéria pulmonar pode potenciar o aumento da pré-carga do ventrículo direito, culminando em ICC direita e choque circulatório (Souza-Costa et al., 2005), o que poderia explicar os sinais observados neste cão. Sabe-se, também, que a doxorubicina possui um elevado potencial protrombótico, ao alterar as propriedades hemostáticas das células endoteliais e dos monócitos, induzindo nestas um fenótipo procoagulante (Swystun et al., 2009). Desta forma, o tratamento com a antraciclina pode, também, ter potenciado o quadro clínico observado.

Relativamente aos biomarcadores, a alteração mais evidente foi observada nos valores de cTnI, os quais aumentaram em todos os estádios. Nos três canídeos denotou-se uma elevação das troponinas nos últimos estádios, o que coincidiu com o final do protocolo quimioterápico e com o período após o mesmo. Tanto o animal C1, como o C3, apresentavam evidências de doença cardíaca, o que pode ter estado na base da elevação das troponinas, contudo, foi o canídeo C2 que demonstrou os maiores valores deste biomarcador. Esta última paciente tinha um hemangiossarcoma esplênico, que sofreu uma disseminação hepática e peritoneal (diagnosticada após término da quimioterapia), sendo, por si só, um processo neoplásico agressivo. Apesar de não apresentar evidências de envolvimento cardíaco pelo tumor, nem qualquer alteração cardíaca à ecocardiografia, esta cadela poderia ter uma patologia miocárdica não neoplásica, oculta, que não fosse detetável no exame ecocardiográfico. Segundo Chun, Kellihan, Henik, & Stepien, (2010), valores de cTnI superiores a 2,45 ng/mL são sugestivos de envolvimento cardíaco em cães com hemangiossarcoma, porém, a paciente em questão não exibiu valores superiores a 1,43 ng/mL. Um aumento na concentração sérica de cTnI pode, também, ocorrer em cães tratados com doxorubicina, não estando necessariamente correlacionado com alterações cardíacas funcionais (Selting et al., 2004). É bastante provável que a antraciclina tenha influenciado a elevação da cTnI nesta cadela, o que é suportado pelo facto de esta elevação ter ocorrido no final do protocolo quimioterápico, quando é atingida a maior concentração cumulativa de doxorubicina.

O pro-BNP apenas apresentou valores mais discordantes nos controlos T1 e T2

(entre 1150 e 1380 pmol/L), todavia, o laboratório INNO considera que, valores entre 900 e 1800 pmol/L não permitem a distinção entre sinais clínicos decorrentes de insuficiência cardíaca ou outras causas. Durante o tratamento, esta cadela evidenciou uma ligeira anemia. Segundo um estudo, em medicina humana, o BNP correlaciona-se inversamente com a concentração de hemoglobina no sangue, podendo a presença de anemia contribuir para uma elevação na concentração plasmática de BNP em indivíduos saudáveis (Matsumoto et al., 2008).

De uma forma geral, o pro-BNP apresentou uma grande variação de valores nos três animais, denotando-se uma súbita elevação no último estágio. Ao contrário das troponinas, este biomarcador pode ser influenciado por vários fatores, incluindo fatores não cardíacos, o que pode explicar as variações observadas. Há que ter, ainda, em consideração o aumento exponencial observado no estágio T4, no canídeo C3 (2330 pmol/L), decorrente da sua insuficiência cardíaca descompensada, o que contribuiu para o aumento final observado na curva de valores medianos dos três animais.

A cadela C2 foi a que apresentou a média mais elevada de biomarcadores, tendo sido também a que apresentou o menor TMS (119 dias), em comparação com os restantes canídeos, C1 (160 dias) e C3 (159 dias), denotando-se uma correlação inversa entre as duas variáveis.

## **6. Limitações do estudo**

A principal limitação deste estudo é, definitivamente, o reduzido tamanho amostral.

A oncologia é uma especialidade que se caracteriza por um elevado número de perdas de seguimento (*Lost to Follow Up*), sobretudo, devido à morte dos animais. Dos canídeos que foram, inicialmente, selecionados para o estudo, por reunirem todos os critérios de seleção, apenas 33% (3/9) permaneceram no mesmo, após o primeiro estágio (T0). Uma cadela, de raça *Boxer*, com linfoma B, e um cão, de raça Pastor Alemão, com linfoma T, morreram quatro e sete dias após o diagnóstico, respetivamente, não tendo iniciado a quimioterapia.

Outra característica da especialidade oncológica assenta no facto de esta ser uma área dispendiosa para os proprietários de animais que são tratados com quimioterapia. Os protocolos quimioterápicos exigem gastos consideráveis, disponibilidade e tempo para comparecer regularmente às consultas no veterinário. Desta forma, muitos dos animais que são referenciados para médicos oncologistas, acabam por não dar seguimento ao tratamento por decisão dos seus proprietários. Esta situação ocorreu com dois animais do estudo, um cão

de raça *Caniche* e uma cadela SRD, ambos com diagnóstico de linfoma.

Antes da instituição de um tratamento quimioterápico é necessário assegurar todas as condições necessárias para que os animais mantenham a máxima qualidade de vida e a mínima toxicidade. Esta foi outra das dificuldades encontradas no estudo. Uma cadela *Pit Bull* apresentou vários episódios de vômito, alterações nas análises bioquímicas (aumento da ALT) e um resultado anormal no teste cPLI (aumento da lípase pancreática), tendo surgido a necessidade de substituição da doxorrubicina por carboplatina. Finalmente, outro cão da raça anteriormente referida, com linfoma, interrompeu o protocolo CHOP, durante a 9ª semana de tratamento, uma vez que o seu tumor saiu de remissão. Este paciente passou a ser tratado apenas com Lomustina, tendo, assim, que abandonar o estudo. Desta forma, a substituição da doxorrubicina por outro quimioterápico foi mais uma das limitações do estudo.

O tamanho da amostra e a imprevisibilidade da evolução dos tumores e da capacidade de cooperação dos proprietários são as grandes limitações deste tipo de estudo. O reduzido número de animais impossibilitou uma avaliação estatística inferencial, limitando também dessa forma, as conclusões que podem ser retiradas do estudo.

## 7. Conclusão

Neste trabalho pretendeu-se avaliar a ocorrência de cardiotoxicidade associada à doxorubicina, através de controlos ecocardiográficos e de biomarcadores, em diferentes estádios do tratamento. Os valores dos parâmetros ecocardiográficos mantiveram-se dentro dos limites normais, com a exceção do rácio AE/Ao e do AE, em dois animais que apresentavam doença cardíaca pré-existente (DMVM), pertencentes à classe B2 da classificação ACVIM. Os animais desta classe constituem um grupo de risco no desenvolvimento de cardiotoxicidade, pois, apesar de serem considerados aptos para receberem quimioterapia com doxorubicina, (uma vez que são assintomáticos e possuem uma função cardíaca normal), eles já apresentam sinais de remodelagem cardíaca, o que pode representar um risco a longo prazo, sobretudo, se existirem outras patologias concomitantes. Provavelmente, apesar de não terem sido observadas alterações compatíveis com cardiotoxicidade, a doxorubicina pode ter contribuído para o agravamento da função cardíaca dos animais. A alteração mais evidente no estudo foi uma elevação consistente das troponinas ao longo de todos os estádios, ultrapassando o limite de referência no final do tratamento, quando a dose cumulativa de doxorubicina foi superior. Este facto apoia a hipótese do envolvimento da doxorubicina na deterioração celular do miocárdio, num mecanismo que depende da dose total administrada.

Conclui-se que nenhum dos animais avaliados parece ter desenvolvido cardiotoxicidade secundária à doxorubicina, no entanto, uma elevação persistente das troponinas sugeriu algum grau de comprometimento do miocárdio no final do protocolo. Tais alterações deveriam ter sido confirmadas através de uma análise histológica. O reduzido tamanho da amostra limitou a interpretação dos resultados obtidos e respetivas conclusões. Desta forma, sugere-se uma amostra maior, para estudos futuros.

O principal objetivo desta dissertação é alertar para a importância de uma prevenção e controlo frequentes, antes, durante e após um tratamento quimioterápico com doxorubicina. A ecocardiografia desempenha um papel fundamental na avaliação cardíaca funcional e estrutural, devendo ser realizada frequentemente. A cTnI parece ser um biomarcador mais eficaz de lesão cardíaca, devendo, em conjunto com a ecocardiografia, fazer parte de cada controlo. Certamente, desta forma será possível fazer um diagnóstico precoce de cardiotoxicidade ou, pelo menos, de outras patologias cardíacas ocultas ou mesmo de um envolvimento cardíaco de origem neoplásica, que podem contribuir para um agravamento da saúde de cada paciente.

## 8. Bibliografia

- Abbott, J. (2000). Syncope and Sudden Cardiac Death. In Abbott, J. (Ed.), *Small Animal Cardiology Secrets* (1st ed., p. 23). Hanley & Belfus, Inc.
- Alderton, M., Gross, J., & Green, D. (1992). Comparative Study of Doxorubicin , Mitoxantrone , and Epirubicin in Combination with ICRF-187 ( ADR-529 ) in a Chronic Cardiotoxicity Animal Model '. *Cancer Research*, 52, 194–201.
- Alves de Souza, R. C. & Camacho, A. A. (2006). Neurohormonal, hemodynamic, and electrocardiographic evaluations of healthy dogs receiving long-term administration of doxorubicin. *American Journal of Veterinary Research*, 67(8), 1319–1325.
- Angelis, A., Urbanek, K., Cappetta, D., Piegari, E., Ciuffreda, L. P., Rivellino, A. et al. (2016). Doxorubicin cardiotoxicity and target cells: a broader perspective. *Cardio-Oncology*, 2(1), 1–8.
- Argyle, D., Brearley, M., Turek, M., & Roberts, L. (2008). Cancer Treatment Modalities. In Argyle, D. (Ed.), *Decision Making in Small Animal Oncology* (1st ed., pp. 69–99). Iowa: Wiley-Blackwell.
- Argyle, D. J. (2008). What is new in canine and feline Lymphoma. In *Proceedings of the 33rd World Small Animal Veterinary Congress* (pp. 518–520). Dublin.
- Atas, E., Kismet, E., Kesik, V., Karaoglu, B., Aydemir, G., Korkmazer, N. et al. (2015). Cardiac troponin-I, brain natriuretic peptide and endothelin-1 levels in a rat model of doxorubicin-induced cardiac injury. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 11(4), 882.
- Atkins, C., Bonagura, J., Ettinger, S., Fox, P., Gordon, S., Haggstrom, J. et al. (2009). Guidelines for the diagnosis and treatment of canine chronic valvular heart disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(6), 1142–1150.
- Atkinson A., J., Colburn, W., DeGruttola, V., DeMets, D., Downing, G., Hoth, D. et al. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 69(3), 89–95.
- Bachur, N. R., Gordon, S. L., Gee, M. V., & Kon, H. (1979). NADPH cytochrome P-450 reductase activation of quinone anticancer agents to free radicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(2), 954–7.
- Baisan, R. A., Rosa, A. De, Loria, A. Di, Vulpe, V., & Piantedosi, D. (2014). Cardiac biomarkers in clinical practice of dog and cat – a review, 8(1), 50–58.

- Banco, B., Grieco, V., Servida, F., & Giudice, C. (2011). Sudden death in a dog after Doxorubicin chemotherapy. *Veterinary Pathology*, *48*(5), 1035–1037.
- Bergman, P. J. (2010). Hemangiosarcoma. In Ettinger, S. & Feldman, E. (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine* (7th ed., pp. 2134–2136). St. Louis: Saunders.
- Berthiaume, J. M. & Wallace, K. B. (2007). Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity. *Cell Biology and Toxicology*, *23*(1), 15–25.
- Bjelogrlic, S. K., Radic, J., Jovic, V., & Radulovic, S. (2005). Activity of d, l- $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E) against Cardiotoxicity Induced by Doxorubicin and Doxorubicin with Cyclophosphamide in Mice. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, *97*, 311–319.
- Boon, J. (2011a). Myocardial diseases. In Boon, J. A. (Ed.), *Veterinary Echocardiography* (2nd ed., pp. 494–507). Wiley-Blackwell.
- Boon, J. (2011b). Evaluation of size, function, and hemodynamics. In Boon, J. A. (Ed.), *Veterinary Echocardiography* (2nd ed., pp. 266–280). Wiley-Blackwell.
- Boon, J. (2011c). Acquired Valvular Disease. In Boon, J. (Ed.), *Veterinary Echocardiography* (2nd ed., p. 394). Wiley-Blackwell.
- Borgarelli, M., Abbott, J., Braz-Ruivo, L., Chiavegato, D., Crosara, S., Lamb, K. et al. (2015). Prevalence and Prognostic Importance of Pulmonary Hypertension in Dogs with Myxomatous Mitral Valve Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *29*(2), 569–574.
- Borgarelli, M., Crosara, S., Lamb, K., Savarino, P., La Rosa, G., Tarducci, A. et al. (2012). Survival characteristics and prognostic variables of dogs with preclinical chronic degenerative mitral valve disease attributable to myxomatous degeneration. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *26*(1), 69–75.
- Borgarelli, M., Santilli, R. a, Chiavegato, D., D’Agnolo, G., Zanatta, R., Mannelli, A. et al. (2006). Prognostic indicators for dogs with dilated cardiomyopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, *20*, 104–110.
- Breed, J. G. S., Zimmerman, A. N. E., & Dormans, J. A. M. A. (1980). Failure of the antioxidant vitamin E to protect against adriamycin-induced cardiotoxicity in the rabbit. *Cancer Research*, *40*(6), 2033–2038.
- Bristow, M. R. (1980). Acute and Chronic Cardiovascular Effects of Doxorubicin in the Dog. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, *2*(5), 487–515.

- Bristow, M. R., Lopez, M. B., Mason, J. W., Billingham, M. E., & Winchester, M. A. (1982). Efficacy and cost of cardiac monitoring in patients receiving doxorubicin. *Cancer*, *50*(1), 32–41.
- Bulwer, B., Solomon, S., & Janardhanan, R. (2007). Echocardiographic Assessment of Ventricular Systolic Function. In Solomon, S. (Ed.), *Essential Echocardiography* (pp. 98–99). New Jersey: Humana Press.
- Cardinale, D., Sandri, M. T., Martinoni, A., Tricca, A., Civelli, M., Lamantia, G. et al. (2000). Left ventricular dysfunction predicted by early troponin I release after high-dose chemotherapy. *Journal of the American College of Cardiology*, *36*(2), 517–522.
- Chatterjee, K., Zhang, J., Honbo, N., & Karliner, J. S. (2010). Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology*, *115*(2), 155–162.
- Chetboul, V., Serres, F., Tissier, R., Lefebvre, H., Sampedrano, C., Gouni, V. et al. (2009). Association of plasma N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration with mitral regurgitation severity and outcome in dogs with asymptomatic degenerative mitral valve disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *23*(5), 984–994.
- Chetboul, V. & Tissier, R. (2012). Echocardiographic assessment of canine degenerative mitral valve disease. *Journal of Veterinary Cardiology*, *14*(1), 127–148.
- Chun, R., Garrett, L. D., & Vail, D. M. (2000). Evaluation of a High-Dose Chemotherapy Protocol with No Maintenance Therapy for Dogs with Lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, *2*(Table 4), 120–124.
- Chun, R., Kellihan, H. B., Henik, R. a, & Stepien, R. L. (2010). Comparison of plasma cardiac troponin I concentrations among dogs with cardiac hemangiosarcoma, noncardiac hemangiosarcoma, other neoplasms, and pericardial effusion of nonhemangiosarcoma origin. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *237*(7), 806–811.
- Cohn, L. (2010). Pulmonary Parenchymal Disease. In Ettinger, S. & Feldman, E. (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine* (7th ed., pp. 135–136). St. Louis: Saunders.
- Cooley, D. M., Schlittler, D. L., Glickman, L. T., Hayek, M., & Waters, D. J. (2003). Exceptional Longevity in Pet Dogs Is Accompanied by Cancer Resistance and Delayed Onset of Major Diseases. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, *58*(12), 1078–1084.
- Cornell, C. C., Kittleson, M. D., Della Torre, P., Häggström, J., Lombard, C. W., Pedersen, H.

- D. et al. (2004). Allometric Scaling of M-Mode Cardiac Measurements in Normal Adult Dogs. *J Vet Intern Med*, 18(1), 311–321.
- Côté, E., Edwards, N. J., Ettinger, S. J., Luis Fuentes, V., Macdonald, K. A., Scansen, B. A. et al. (2015). Management of incidentally detected heart murmurs in dogs and cats. *Journal of Veterinary Cardiology*, 17(4), 245–261.
- Curigliano, G., Cardinale, D., Dent, S., Criscitiello, C., Aseyev, O., Lenihan, D. et al. (2016). Cardiotoxicity of Anticancer Treatments : Epidemiology, Detection, and Management. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 0(0), 309–325.
- Davies, K. J. A. & Doroshov, J. H. (1986). Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. I. Anthracycline radical formation by NADH dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 261(7), 3060–3067.
- DeFrancesco, T. (2011). Cardiac biomarkers. *Clinicians Brief*, 9(2), 15–19.
- Dobson, J. M., Hohenhaus, A. E., & Peaston, A. E. (2008). Cancer Chemotherapy. In Page, S. W. & Maddison, J. E. (Eds.), *Small Animal Clinical Pharmacology* (2nd ed., pp. 331–334). Elsevier.
- FitzPatrick, W. M., Dervisis, N. G., & Kitchell, B. E. (2010). Safety of concurrent administration of dexrazoxane and doxorubicin in the canine cancer patient. *Veterinary and Comparative Oncology*, 8(4), 273–282.
- Frimberger, A. E. (2010). Principles of Chemotherapy. In Ettinger, S. J. & Feldman, E. C. (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine* (7th ed., pp. 2046–2047). St. Louis: Saunders.
- Fuentes, V. (2008). Echocardiography and Doppler Ultrasound. In Tilley, L., Smith, F., Oyama, M., & Sleeper, M. (Eds.), *Manual of Canine and Feline Cardiology* (4th ed., pp. 87–90). St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Ganz, W., Sridhar, K., Ganz, S., Gonzalez, R., Chakko, S., & Serafini, A. (1996). Review of Tests for Monitoring Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. *Oncology*, 53(6), 461–470.
- Garden, O. A. (2010). Immune-Mediated Diseases and Therapies. In Ettinger, S. J. & Feldman, E. C. (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine* (7th ed., pp. 2140–2147). St. Louis: Saunders.
- Gewirtz, D. A. (1999). A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical Pharmacology*, 57(7), 727–741.

- Gilbert, C. M., Filippich, L. J., McGeary, R. P., & Charles, B. G. (2006). Pharmacokinetics of doxorubicinol in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 29(5), 433–435.
- Gilbert, C. M., Filippich, L. J., McGeary, R. P., & Charles, B. G. (2007). Toxicokinetics of the active doxorubicin metabolite, doxorubicinol, in sulphur-crested cockatoos (*Cacatua galerita*). *Research in Veterinary Science*, 83(1), 123–129.
- Gillings, S., Johnson, J., Fulmer, A., & Hauck, M. (2009). Effect of a 1-hour IV infusion of doxorubicin on the development of cardiotoxicity in dogs as evaluated by electrocardiography and echocardiography. *Veterinary Therapeutics: Research in Applied Veterinary Medicine*, 10(1–2), 46–58.
- Goodman, J. & Hochstein, P. (1977). Generation of free radicals and lipid peroxidation by redox cycling of adriamycin and daunomycin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 77(2), 797–803.
- Grem, J. L. & Keith, B. (2005). Mechanisms of Action of Cancer Chemotherapeutic Agents: Antimetabolites. In *The Cancer Handbook*. CHAP, John Wiley & Sons, Ltd.
- Gugjoo, M. B., Hoque, M., Saxena, A. C., Shamsuz Zama, M. M., & Dey, S. (2014). Reference values of M-mode echocardiographic parameters and indices in conscious Labrador Retriever dogs. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 15(4), 341–346.
- Gustafson, D. L. & Page, R. L. (2013). Cancer Chemotherapy. In Withrow, S. J. & Vail, D. M. (Eds.), *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* (5th ed., pp. 157–171). St. Louis, Missouri: Elsevier Health Sciences.
- Gustafson, D. L., Rastatter, J. C., Colombo, T., & Long, M. E. (2002). Doxorubicin pharmacokinetics: Macromolecule binding, metabolism, and excretion in the context of a physiologic model. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91(6), 1488–1501.
- Haggstrom, J., Boswood, A., O'Grady, M., Jons, O., Smith, S., Swift, S. et al. (2008). Effect of Pimobendan or Benazepril Hydrochloride on Survival Times in Dogs with Congestive Heart Failure Caused by Naturally Occurring Myxomatous Mitral Valve Disease: The QUEST Study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(5), 1124–1135.
- Hahn, K. A. (2002). Principles of Chemotherapy. In Hahn, K. (Ed.), *Veterinary Oncology* (1st ed., pp. 133–164). Woburn: Butterworth-Heinemann.
- Hahn, K., Richardson, R., Teclaw, R., Cline, J., Carlton, W., DeNicola, D. et al. (1992). Is maintenance chemotherapy appropriate for the management of canine malignant

- lymphoma? *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 6(1), 3–10.
- Hanai, K., Takabe, K., Manabe, S., Nakano, M., Kohda, A., & Matsuo, M. (1996). Evaluation of cardiac function by echocardiography in dogs treated with doxorubicin. *The Journal of Toxicological Sciences*, 21(1), 1–10. article.
- Handa, K. & Sato, S. (1975). Generation of free radicals of quinone group-containing anti-cancer chemicals in NADPH-microsome system as evidenced by initiation of sulfite oxidation. *Gann*, 66(1), 43–47.
- Harris, L., Batist, G., Belt, R., Rovira, D., Navari, R., Azarnia, N. et al. (2002). Liposome-encapsulated doxorubicin compared with conventional doxorubicin in a randomized multicenter trial as first-line therapy of metastatic breast carcinoma. *Cancer*, 94(1), 25–36.
- Harsdorf, R. von, Li, P.-F., & Dietz, R. (1999). Signaling Pathways in Reactive Oxygen Species Induced Cardiomyocyte Apoptosis. *Circulation*, 99, 2934–2941.
- Hasinoff, B. B. (2008). The use of dexrazoxane for the prevention of anthracycline extravasation injury. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 17, 217–223.
- Hayakawa, H., Komada, Y., Hirayama, M., Hori, H., Ito, M., & Sakurai, M. (2001). Plasma levels of natriuretic peptides in relation to doxorubicin-induced cardiotoxicity and cardiac function in children with cancer. *Medical and Pediatric Oncology*, 37(1), 4–9.
- Herman, E. H. & Ferrans, V. J. (1998). Preclinical animal models of cardiac protection from anthracycline-induced cardiotoxicity. *Seminars in Oncology*, 25(4), 15–21.
- Herman, E. H., Viel, J. A., Rahmar, A., Schein, P. S., & Ferrara, J. V. (1983). Prevention of Chronic Doxorubicin Cardiotoxicity in Beagles by Liposomal Encapsulation. *Cancer Research*, 43(11), 5427–5432.
- Higginbotham, M. L., McCaw, D. L., Roush, J. K., Nietfeld, J. C., Wilkerson, M. J., Reeds, K. et al. (2013). Intermittent single-agent doxorubicin for the treatment of canine B-cell lymphoma. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 49(6), 357–62.
- Ho, C. (2007). Echocardiographic Assessment of Diastolic Function. In Solomon, S. (Ed.), *Essential Echocardiography: A Practical Handbook* (pp. 119–125). Totowa: Humana Press.
- Holmberg, S. R. & Williams, A. J. (1990). Patterns of interaction between anthraquinone drugs and the calcium-release channel from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Circulation Research*, 67(2), 272–83.
- Jiji, R. S., Kramer, C. M., & Salerno, M. (2012). Non-invasive imaging and monitoring

- cardiotoxicity of cancer therapeutic drugs. *Journal of Nuclear Cardiology*, 19(2), 377–388.
- Kalivendi, S. V., Kotamraju, S., Zhao, H., Joseph, J., & Kalyanaraman, B. (2001). Doxorubicin-induced apoptosis is associated with increased transcription of endothelial nitric-oxide synthase: Effect of antiapoptotic antioxidants and calcium. *Journal of Biological Chemistry*, 276(50), 47266–47276.
- Kalyanaraman, B., Joseph, J., Kalivendi, S., Wang, S., Konorev, E., & Kotamraju, S. (2002). Doxorubicin-induced apoptosis: Implications in cardiotoxicity. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 234–235, 119–124.
- Kanter, P. M., Bullard, G. A., Pilkiewicz, F. G., Mayer, L. D., Cullis, P. R., & Pavelic, Z. P. (1993). Preclinical toxicology study of liposome encapsulated doxorubicin (TLC D-99): comparison with doxorubicin and empty liposomes in mice and dogs. *In Vivo (Athens, Greece)*, 7(1), 85–95.
- Kariyil, B. J. (2011). Antineoplastic Drugs: Treatment Principles and Toxicity. *Veterinary World*, 4(126), 380–382.
- Kellihan, H. (2010). Pulmonary Hypertension and Pulmonary Thromboembolism. In Ettinger, S. & Feldman, L. (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine* (7th ed., pp. 180–182). St. Louis: Saunders.
- Kellihan, H. B. & Stepien, R. L. (2010). Pulmonary Hypertension in Dogs: Diagnosis and Therapy. *Veterinary Clinics of NA: Small Animal Practice*, 40(4), 623–641.
- Kotamraju, S., Konorev, E. A., Joseph, J., & Kalyanaraman, B. (2000). Doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and cardiomyocytes is ameliorated by nitron spin traps and ebselen. Role of reactive oxygen and nitrogen species. *Journal of Biological Chemistry*, 275(43), 33585–33592.
- Kristal, O., Lana, S. E., Ogilvie, G. K., Rand, W. M., Cotter, S. M., & Moore, a S. (2001). Single agent chemotherapy with doxorubicin for feline lymphoma: a retrospective study of 19 cases (1994-1997). *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 15(2), 125–130.
- Kumar, D., Kirshenbaum, L., Li, T., Danelisen, I., & Singal, P. (1999). Apoptosis in isolated adult cardiomyocytes exposed to adriamycin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 874(204), 156–168.
- Kusuoka, H., Futaki, S., Koretsune, Y., Kitabatake, A., Suga, H., Kamada, T. et al. (1991). Alterations of Intracellular Calcium Homeostasis and Myocardial Energetics in Acute

- Adriamycin-Induced Heart Failure. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 18(3), 437–44.
- Langer, S. W., Sehested, M., & Jensen, P. B. (2000). Treatment of Anthracycline Extravasation with Dexrazoxane. *American Association for Cancer Research*, 6(9), 3680–3686.
- Langer, S. W., Sehested, M., & Jensen, P. B. (2001). Dexrazoxane is a potent and specific inhibitor of anthracycline induced subcutaneous lesions in mice. *Annals of Oncology*, 12(3), 405–410.
- Langhorn, R. & Willesen, J. L. (2016). Cardiac Troponins in Dogs and Cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30(1), 36–50.
- Lee, H. S., Son, C. B., Shin, S. H., & Kim, Y. S. (2008). Clinical correlation between brain natriuretic peptide and anthracycline-induced cardiac toxicity. *Cancer Research and Treatment : Official Journal of Korean Cancer Association*, 40(3), 121–126.
- Lee, Y., Kang, M., & Park, H. (2015). Case Report: Anthracycline-induced cardiomyopathy in a dog treated with epirubicin. *The Canadian Veterinary Journal*, 56(6), 571–574.
- Levine, S. (1933). The Systolic Murmur. Its Clinical Significance. *JAMA*, 101(6), 436–438.
- Lin, S., Fagan, K. A., Li, K. X., Shaul, P. W., Cooper, D. M. F., & Rodman, D. M. (2000). Sustained endothelial nitric-oxide synthase activation requires capacitative Ca<sup>2+</sup> entry. *Journal of Biological Chemistry*, 275(24), 17979–17985.
- Lori, J. C., Stein, T. J., & Thamm, D. H. (2010). Doxorubicin and cyclophosphamide for the treatment of canine lymphoma: a randomized, placebo-controlled study. *Veterinary and Comparative Oncology*, 8(3), 188–195.
- Lu, P. (2005). Monitoring cardiac function in patients receiving doxorubicin. *Seminars in Nuclear Medicine*, 35(3), 197–201.
- Mahoney, J. a, Bergman, P. J., Camps-Palau, M. a, & Hull, T. L. (2007). Treatment of doxorubicin extravasation with intravenous dexrazoxane in a cat. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21, 872–873.
- Matsui, H., Morishima, I., Numaguchi, Y., Toki, Y., Okumura, K., & Hayakawa, T. (1999). Protective effects of carvedilol against doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *Life Sciences*, 65(12), 1265–1274.
- Matsumoto, M., Tsujino, T., Naito, Y., Lee-Kawabata, M., Ezumi, A., Yamamoto, K. et al. (2008). Anemia as a factor that elevates plasma brain natriuretic peptide concentration in apparently healthy subjects. *International Heart Journal*, 49(5), 577–586.

- Mauldin, G. E., Fox, P. R., Patnaik, a K., Bond, B. R., Mooney, S. C., & Matus, R. E. (1992). Doxorubicin-induced cardiotoxicosis. Clinical features in 32 dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 6(2), 82–8.
- Merlo, D. F., Rossi, L., Pellegrino, C., Ceppi, M., Cardellino, U., Capurro, C. et al. (2008). Cancer incidence in pet dogs: Findings of the animal tumor registry of Genoa, Italy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(4), 976–984.
- Migrino, R. Q., Aggarwal, D., Konorev, E., Brahmhatt, T., Bright, M., & Kalyanaraman, B. (2008). Early Detection of Doxorubicin Cardiomyopathy Using Two-Dimensional Strain Echocardiography. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 34(2), 208–214.
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., & Gianni, L. (2004). Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*, 56(2), 185–229.
- Mitry, M. A. & Edwards, J. G. (2016). Doxorubicin induced heart failure: Phenotype and molecular mechanisms. *IJC Heart and Vasculature*, 10, 17–24.
- Momin, F. N., Kalai, B. R., Shikalgar, T. S., & Naikwade, N. S. (2012). Cardioprotective effect of methanolic extract of *Ixora coccinea* Linn. leaves on doxorubicin-induced cardiac toxicity in rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 44(2), 178–83.
- Monnet, E. & Orton, E. C. (1999). A canine model of heart failure by intracoronary Adriamycin injection: Hemodynamic and energetic results. *Journal of Cardiac Failure*, 5(3), 255–264.
- Monsuez, J. J., Charniot, J. C., Vignat, N., & Artigou, J. Y. (2010). Cardiac side-effects of cancer chemotherapy. *International Journal of Cardiology*, 144(1), 3–15.
- Moore, A. & Frimberger, A. (2010). Chemotherapy. In *Oncology for Veterinary Technicians and Nurses* (1st ed., pp. 73–75). Iowa: Wiley-Blackwell.
- Moore, A. S. (2010). Practical Chemotherapy. In Ettinger, S. & Feldman, E. (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine* (7th ed., pp. 2058–2060). St. Louis: Saunders.
- Myers, C. E., McGuire, W. P., Liss, R. H., Ifrim, I., Grotzinger, K., & Young, R. C. (1977). The role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. *Science*, 197(4299), 165–167.
- Nicolay, K., Fok, J. J., Voorhout, W., Post, J. A., & Kruijff, B. de. (1986). Cytofluorescence detection of adriamycin-mitochondria interactions in isolated, perfused rat heart. *Biochimica et Biophysica Acta*, 887, 35–41.

- North, S. M. & Banks, T. A. (2009). Principles of chemotherapy. In North, S. & Banks, T. (Eds.), *Small Animal Oncology: An Introduction* (1st ed., pp. 31–40). Edinburgh: Saunders.
- Octavia, Y., Tocchetti, C. G., Gabrielson, K. L., Janssens, S., Crijns, H. J., & Moens, A. L. (2012). Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 52(6), 1213–1225.
- Ogilvie, G. K., Vail, D. M., Klein, M. K., Powers, B. E., & Dickinson, K. (1991). Weekly administration of low-dose doxorubicin for treatment of malignant lymphoma in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 198(10), 1762–1764.
- Oliveira, P. J., Bjork, J. A., Santos, M. S., Leino, R. L., Froberg, M. K., Moreno, A. J. et al. (2004). Carvedilol-mediated antioxidant protection against doxorubicin-induced cardiac mitochondrial toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 200(2), 159–168.
- Olson, R. D., Mushlin, P. S., Brenner, D. E., Fleischer, S., Cusack, B. J., Chang, B. K. et al. (1988). Doxorubicin cardiotoxicity may be caused by its metabolite, doxorubicinol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(10), 3585–3589.
- Oyama, M. a & Sisson, D. D. (2004). Cardiac troponin-I concentration in dogs with cardiac disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 18(6), 831–839.
- Oyama, M., Rush, J., Rozanski, E., Fox, P., Reynolds, C., Gordon, S. et al. (2009). Assessment of serum N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration for differentiation of congestive heart failure from primary respiratory tract disease as the cause of respiratory signs in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 235(11), 1319–1325.
- Pan, S. S. & Bachur, N. R. (1980). Xanthine oxidase catalysed reductive cleavage of anthracycline antibiotics and free radical formation. *Molecular Pharmacology*, 17, 95–99.
- Peaston, a E. & Maddison, J. E. (1999). Efficacy of doxorubicin as an induction agent for cats with lymphosarcoma. *Australian Veterinary Journal*, 77(7), 442–4.
- Pereira, G., Petrus, L., Santos, A., Yamaki, F., & Larsson, M. (2009). Evaluation of left ventricular diastolic echocardiographic parameters in healthy dogs by pulsed-wave

- Doppler 1. *Pesq. Vet. Bras.*, 29(4), 291–294.
- Pereira Neto, G. B., Andrade, J. N. B., Sousa, M. G., & Camacho, A. A. (2006). Holter electrocardiography in dogs showing doxorubicin-induced dilated cardiomyopathy. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria E Zootecnia*, 58(6), 1037–1042.
- Piek, C. J., Rutteman, G. R., & Teske, E. (1999). Evaluation of the results of a L-asparaginase-based continuous chemotherapy protocol versus a short doxorubicin-based induction chemotherapy protocol in dogs with malignant lymphoma. *The Veterinary Quarterly*, 21(January), 44–49.
- Pinkel, D. (1958). The use of body surface area as a criterion of drug dosage in cancer chemotherapy. *Cancer Research*, 18(7), 853–856.
- Postorino, N. C., Susaneck, S. J., Withrow, S. J., Macy, D. W., & Harris, C. (1989). Single agent therapy with adriamycin for canine lymphosarcoma. *The Journal of the American Animal Hospital Association (USA)*, 25(2), 221–226.
- Price, G. S. & Frazier, D. L. (1998). Use of body surface area (BSA)-based dosages to calculate chemotherapeutic drug dose in dogs: I. Potential problems with current BSA formulae. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 12(4), 267–271.
- Price, G. S., Page, R. L., Fischer, B. M., Levine, J. F., & Gerig, T. M. (1991). Efficacy and toxicity of doxorubicin/cyclophosphamide maintenance therapy in dogs with multicentric lymphosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 5(5), 259–262.
- Prosek, R., Sisson, D. D., Oyama, M. a., & Solter, P. F. (2007). Distinguishing cardiac and noncardiac dyspnea in 48 dogs using plasma atrial natriuretic factor, B-type natriuretic factor, endothelin, and cardiac troponin-I. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 21(2), 238–242.
- Rahman, A. M., Yusuf, S. W., & Ewer, M. S. (2007). Anthracycline-induced cardiotoxicity and the cardiac-sparing effect of liposomal formulation. *International Journal of Nanomedicine*, 2(4), 567–583.
- Ratterree, W., Gieger, T., Pariaut, R., Saelinger, C., & Strickland, K. (2012). Value of Echocardiography and Electrocardiography as Screening Tools Prior to Doxorubicin Administration, 89–96.
- Rishniw, M. & Erb, H. N. (2000). Evaluation of four 2-dimensional echocardiographic methods of assessing left atrial size in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine /*

- American College of Veterinary Internal Medicine*, 14(4), 429–435.
- Sawyer, D. B., Fukazawa, R., Arstall, M. A., & Kelly, R. A. (1999). Daunorubicin-induced apoptosis in rat cardiac myocytes is inhibited by dexrazoxane. *Circulation Research*, 84(3), 257–265.
- Schlame, M., Rua, D., & Greenberg, M. L. (2000). The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Progress in Lipid Research*, 39(3), 257–288.
- Schober, K. E. & Fuentes, V. L. (2001). Effects of age, body weight, and heart rate on transmitral and pulmonary venous flow in clinically normal dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 62(9), 1447–1454.
- Selting, K. a, Lana, S. E., Ogilvie, G. K., Olmstead, a, Mykles, D. L., Bright, J. et al. (2004). Cardiac troponin I in canine patients with lymphoma and osteosarcoma receiving doxorubicin: comparison with clinical heart disease in a retrospective analysis. *Veterinary and Comparative Oncology*, 2(3), 142–156.
- Serres, F., Chetboul, V., Tissier, R., Poujol, L., Gouni, V., & Sampedrano, C. C. (2008). Comparison of 3 Ultrasound Methods for Quantifying Left Ventricular Systolic Function: Correlation with Disease Severity and Prognostic Value in Dogs with Mitral Valve Disease. *J Vet Intern Med*, 22(3), 566–577.
- Shi, Y., Moon, M., Dawood, S., McManus, B., & Liu, P. P. (2011). Mechanisms and management of doxorubicin cardiotoxicity. *Herz*, 36(4), 296–305.
- Silva, C. E. V & Camacho, A. A. (2005). Alterações ecocardiográficas em cães sob tratamento prolongado com doxorubicina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria E Zootecnia*, 57(3), 300–306.
- Simon, D., Moreno, S. N., Hirschberger, J., Moritz, A., Kohn, B., Neumann, S. et al. (2008). Efficacy of a continuous, multiagent chemotherapeutic protocol versus a short-term single-agent protocol in dogs with lymphoma. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 232(6), 879–885.
- Singal, P. K., Li, T., Kumar, D., Danelisen, I., & Iliskovic, N. (2000). Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 207, 77–86.
- Smith Jr., F., Schrope, D., & Sammarco, C. (2008). Cardiovascular Effects of Systemic Diseases. In Tilley, L., Smith, F., Oyama, M., & Sleeper, M. (Eds.), *Manual of Canine and Feline Cardiology* (4th ed., pp. 240–276). St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Souza-Costa, D., Zerbini, T., Metzger, I., Rocha, J., Gerlach, R., & Tanus-Santos, J. (2005).

- L-Arginine attenuates acute pulmonary embolism-induced oxidative stress and pulmonary hypertension. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 12(1), 9–14.
- Sparano, J. a, Brown, D. L., & Wolff, A. C. (2002). Predicting cancer therapy-induced cardiotoxicity: the role of troponins and other markers. *Drug Safety : An International Journal of Medical Toxicology and Drug Experience*, 25(5), 301–311.
- Swystun, L. L., Shin, L. Y. Y., Beaudin, S., & Liaw, P. C. (2009). Chemotherapeutic agents doxorubicin and epirubicin induce a procoagulant phenotype on endothelial cells and blood monocytes. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7(4), 619–626.
- Takemura, G. & Fujiwara, H. (2007). Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. From the Cardiotoxic Mechanisms to Management. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 49(5), 330–352.
- Tan, T. C. & Scherrer-Crosbie, M. (2012). Assessing the Cardiac Toxicity of Chemotherapeutic Agents: Role of Echocardiography. *Current Cardiovascular Imaging Reports*, 5(6), 403–409.
- Tater, G., Eberle, N., Hungerbuehler, S., Joetzke, A., Nolte, I., Wess, G. et al. (2012). Ventricular fractional shortening in 108 dogs with malignant lymphoma undergoing chemotherapy with a cyclic combination protocol including doxorubicin, 40, 261–266.
- Terasaki, T., Iga, T., Sugiyama, Y., & Hanano, M. (1982). Experimental evidence of characteristic tissue distribution of adriamycin. Tissue DNA concentration as a determinant. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 34(9), 597–600.
- Teske, E., Rutteman, G. R., Kirpenstein, J., & Hirschberger, J. (2011). A randomized controlled study into the efficacy and toxicity of pegylated liposome encapsulated doxorubicin as an adjuvant therapy in dogs with splenic haemangiosarcoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, 9(4), 283–289.
- Thamm, D. H. (2013). Miscellaneous Tumors. In Withrow, S. & Vail, D. (Eds.), *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* (5th ed., pp. 679–683). St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Tilley, L. & Smith, F. (2008a). Right-Sided Congestive Heart Failure. In Tilley, L. & Smith, F. (Eds.), *Blackwell's Five-Minute Veterinary Consult: canine and feline*. (4th ed., pp. 199–200). Blackwell.
- Tilley, L. & Smith, F. (2008b). Pulmonary Thromboembolism. In *Blackwell's Five-Minute Veterinary Consult: canine and feline*. (4th ed., pp. 821–823). Blackwell.
- Torti, F. M., Bristow, M. M., Lum, B. L., Carter, S. K., Howes, A. E., Aston, D. A. et al.

- (1986). Cardiotoxicity of epirubicin and doxorubicin: Assessment by endomyocardial biopsy. *Cancer Research*, *46*(7), 3722–3727.
- Toyoda, Y., Okada, M., & Kashem, M. A. (1998). A canine model of dilated cardiomyopathy induced by repetitive intracoronary doxorubicin administration. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, *115*(6), 1367–1373.
- Vail, D. M. (2010). Hematopoietic Tumors. In Ettinger, S. & Feldman, E. (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine* (7th ed., pp. 2093–2095). St. Louis: Saunders.
- Vail, D. M., Pinkerton, M. E., & Young, K. M. (2013). Hematopoietic Tumors: Canine Lymphoma and Lymphoid Leukemias. In Withrow, S. J. & Vail, D. M. (Eds.), *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* (5th ed., pp. 620–622). St. Louis, Missouri: Elsevier Health Sciences.
- Vásquez-Vivar, J., Martasek, P., Hogg, N., Masters, B. S. S., Pritchard Kirkwood A., & Kalyanaraman, B. (1997). Endothelial Nitric Oxide Synthase-Dependent Superoxide Generation from Adriamycin. *Biochemistry*, *36*(38), 11293–11297.
- Venable, R. O., Saba, C. F., Endicott, M. M., & Northrup, N. C. (2012). Dexrazoxane treatment of doxorubicin extravasation injury in four dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *240*(3), 304–307.
- Vincent, D. T., Ibrahim, Y. F., Espey, M. G., & Suzuki, Y. J. (2013). The role of antioxidants in the era of cardio-oncology. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, *72*(6), 1157–1168.
- Vleet, J. F. Van, Ferrans, V. J., & Weirich, E. (1979). Cardiac Disease Induced by Chronic Adriamycin Administration in Dogs and an Evaluation of Vitamin E and Selenium as Cardioprotectants, (7667).
- Volkova, M. & Russell, R. (2011). Anthracycline cardiotoxicity: Prevalence, pathogenesis and treatment. *Current Cardiology Reviews*, *7*(4), 214–220.
- Von Hoff, D. D., Layard, M. W., Basa, P., David Jr., H. L., Von Hoff, A. L., Rozenzweig, M. et al. (1979). Risk Factors for Doxorubicin-Induced Congestive Heart Failure. *Annals of Internal Medicine*, *91*(5), 710.
- Wang, L., Ma, W., Markovich, R., Chen, J. W., & Wang, P. H. (1998). Regulation of cardiomyocyte apoptotic signaling by insulin-like growth factor I. *Circulation Research*, *83*(5), 516–522.
- Wang, S., Lee, J., & Liao, A. T. (2016). Comparison of efficacy and toxicity of doxorubicin and mitoxantrone in combination chemotherapy for canine lymphoma. *Canadian*

- Veterinary Journal*, 57, 271–276.
- Wang, Y., Madanat, F. F., Kimball, J. C., Gleiser, A., Ali, K., & Michael, W. (1980). Effect of Vitamin E against Adriamycin-induced Toxicity in Rabbits. *Cancer Research*, 40, 1022–1027.
- Wells, S. M. & Sleeper, M. (2008). Cardiac troponins. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 18(3), 235–245.
- Wesselowski, S., Borgarelli, M., Bello, N. M., & Abbott, J. (2014). Discrepancies in Identification of Left Atrial Enlargement Using Left Atrial Volume versus Left Atrial-to-Aortic Root Ratio in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28(5), 1527–1533.
- Wickramasinghe, C. D., Nguyen, K., Watson, K. E., Vorobiof, G., & Yang, E. H. (2016). Concepts in cardio-oncology: definitions, mechanisms, diagnosis and treatment strategies of cancer therapy-induced cardiotoxicity. *Future Oncology*, 12(6), 855–870.
- Wiley, J. L., Rook, K. A., Clifford, C. A., Gregor, T. P., & Sorenmo, K. U. (2010). Efficacy of doxorubicin-based chemotherapy for non-resectable canine subcutaneous haemangiosarcoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, 8(3), 221–233.
- Wittenburg, L. A., Thamm, D. H., & Gustafson, D. L. (2012). Development of a limited-sampling model for prediction of doxorubicin exposure in dogs. *Veterinary and Comparative Oncology*, 12(2), 114–119.
- Working, P. K., Newman, M. S., Sullivan, T., & Yarrington, J. (1999). Reduction of the cardiotoxicity of doxorubicin in rabbits and dogs by encapsulation in long-circulating, pegylated liposomes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 289(2), 1128–1133.
- Yang, F., Teves, S. S., Kemp, C. J., & Henikoff, S. (2014). Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1845(1), 84–89.
- Young, R. C., Ozols, R. F., & Myers, C. E. (1981). The Anthracycline Antineoplastic Drugs. *New England Journal of Medicine*, 305(3), 139–153.
- Zhu, H., Sarkar, S., Scott, L., Danelisen, I., Trush, M., Jia, Z. et al. (2016). Doxorubicin Redox Biology: Redox Cycling, Topoisomerase Inhibition, and Oxidative Stress. *Reactive Oxygen Species*, 1(3), 189–198.

# Anexos

Esquemas Terapêuticos e calendarização dos controlos:

**Tabela 10** – Protocolo CHOP (19 semanas)

Semana	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<b>Ecocardiografia</b>																				
<b>+ colheita de sangue</b>	X					X				X					X					X
<b>Doxorrubicina</b>				X					X					X						X
<b>Vincristina</b>	x		x			x		x			x			x			x			x
<b>Ciclofosfamida</b>		x					x					x						x		
<b>Prednisolona</b>	x	x	x	x																
<b>Análises</b>			x			x		x		x				x		x				x

**Tabela 11** – Protocolo de agente único com doxorrubicina

Semana	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>Ecocardiografia + colheita de sangue</b>	X	X						X			X
<b>Doxorrubicina</b>	x				x			x			x
<b>Análises</b>			x		x	x		x	x		x

Ratio	97.5 Percentile	95 Percentile	75 Percentile	50 Percentile	25 Percentile	5 Percentile	2.5 Percentile	$r^2$ <sup>a</sup>
%ES	47	44	36	33	30	25	23	-0.058ns
LA:Ao	1.3	1.3	1.1	1.0	0.9	0.8	0.7	-0.071ns
LVID <sub>d</sub> :LVW <sub>d</sub>	6.7	6.3	5.1	4.4	3.9	3.1	2.9	0.23*

**Figura 9** – Valores ecocardiográficos em cães; modo-M (utilizado para a FS) (Cornell et al., 2004).

kg	VSd	LVd	LVWd	VSs	LVs	LVWs	AO	LA
1	0.29-0.59	1.27-1.85	0.29-0.60	0.43-0.79	0.71-1.26	0.48-0.87	0.63-0.96	0.59-0.97
2	0.34-0.70	1.56-2.27	0.34-0.70	0.51-0.93	0.88-1.57	0.56-1.01	0.80-1.22	0.75-1.23
3	0.38-0.77	1.75-2.56	0.37-0.77	0.56-1.03	1.00-1.78	0.61-1.11	0.92-1.40	0.86-1.42
4	0.41-0.82	1.91-2.78	0.40-0.83	0.60-1.10	1.10-1.95	0.65-1.18	1.01-1.54	0.95-1.56
5	0.43-0.87	2.04-2.97	0.42-0.87	0.63-1.16	1.18-2.09	0.69-1.24	1.09-1.66	1.03-1.69
6	0.45-0.91	2.15-3.13	0.44-0.91	0.66-1.21	1.25-2.22	0.71-1.29	1.16-1.77	1.09-1.80
7	0.46-0.94	2.25-3.28	0.46-0.94	0.69-1.26	1.31-2.33	0.74-1.34	1.22-1.86	1.15-1.90
8	0.48-0.97	2.34-3.41	0.47-0.97	0.71-1.30	1.37-2.43	0.76-1.38	1.28-1.95	1.21-1.99
9	0.49-1.00	2.42-3.53	0.48-1.00	0.73-1.34	1.42-2.52	0.78-1.42	1.33-2.03	1.26-2.07
10	0.51-1.03	2.50-3.64	0.49-1.02	0.75-1.37	1.47-2.60	0.80-1.45	1.38-2.11	1.31-2.15
11	0.52-1.05	2.57-3.74	0.51-1.05	0.76-1.40	1.51-2.68	0.82-1.48	1.43-2.17	1.35-2.22
12	0.53-1.07	2.64-3.84	0.52-1.07	0.78-1.43	1.55-2.76	0.83-1.51	1.47-2.24	1.39-2.29
13	0.54-1.09	2.70-3.93	0.53-1.09	0.80-1.46	1.59-2.83	0.85-1.54	1.51-2.30	1.43-2.35
14	0.55-1.11	2.76-4.02	0.53-1.11	0.81-1.49	1.63-2.89	0.86-1.56	1.55-2.36	1.47-2.41
15	0.56-1.13	2.82-4.10	0.54-1.12	0.82-1.51	1.67-2.96	0.88-1.59	1.59-2.42	1.50-2.47
16	0.57-1.15	2.87-4.18	0.55-1.14	0.84-1.54	1.70-3.02	0.89-1.61	1.62-2.47	1.54-2.52
17	0.57-1.17	2.92-4.26	0.56-1.16	0.85-1.56	1.73-3.08	0.90-1.63	1.66-2.52	1.57-2.58
18	0.58-1.18	2.97-4.33	0.57-1.17	0.86-1.58	1.76-3.13	0.91-1.65	1.69-2.57	1.60-2.63
19	0.59-1.20	3.02-4.40	0.57-1.19	0.87-1.60	1.80-3.19	0.92-1.67	1.72-2.62	1.63-2.68
20	0.60-1.21	3.06-4.46	0.58-1.20	0.88-1.62	1.82-3.24	0.93-1.69	1.75-2.67	1.66-2.73
21	0.60-1.23	3.11-4.53	0.59-1.22	0.89-1.64	1.85-3.29	0.94-1.71	1.78-2.71	1.69-2.77
22	0.61-1.24	3.15-4.59	0.59-1.23	0.90-1.66	1.88-3.34	0.95-1.73	1.81-2.75	1.71-2.82
23	0.62-1.26	3.19-4.65	0.60-1.24	0.91-1.68	1.91-3.38	0.96-1.75	1.84-2.80	1.74-2.86
24	0.62-1.27	3.23-4.71	0.61-1.25	0.92-1.69	1.93-3.43	0.97-1.76	1.86-2.84	1.77-2.90
25	0.63-1.28	3.27-4.77	0.61-1.27	0.93-1.71	1.96-3.47	0.98-1.78	1.89-2.88	1.79-2.94
26	0.64-1.29	3.31-4.82	0.62-1.28	0.94-1.73	1.98-3.52	0.99-1.79	1.91-2.92	1.82-2.98
27	0.64-1.31	3.35-4.88	0.62-1.29	0.95-1.74	2.01-3.56	1.00-1.81	1.94-2.95	1.84-3.02
28	0.65-1.32	3.38-4.93	0.63-1.30	0.96-1.76	2.03-3.60	1.01-1.82	1.96-2.99	1.86-3.06
29	0.65-1.33	3.42-4.98	0.63-1.31	0.96-1.77	2.05-3.64	1.01-1.84	1.99-3.03	1.89-3.10
30	0.66-1.34	3.45-5.03	0.64-1.32	0.97-1.79	2.07-3.68	1.02-1.85	2.01-3.06	1.91-3.14
31	0.66-1.35	3.49-5.08	0.64-1.33	0.98-1.80	2.09-3.72	1.03-1.86	2.03-3.10	1.93-3.17
32	0.67-1.36	3.52-5.12	0.65-1.34	0.99-1.81	2.12-3.75	1.04-1.88	2.05-3.13	1.95-3.21
33	0.67-1.37	3.55-5.17	0.65-1.35	1.00-1.83	2.14-3.79	1.04-1.89	2.08-3.16	1.97-3.24
34	0.68-1.38	3.58-5.22	0.66-1.36	1.00-1.84	2.16-3.83	1.05-1.90	2.10-3.20	1.99-3.27
35	0.68-1.39	3.61-5.26	0.66-1.37	1.01-1.85	2.18-3.86	1.06-1.92	2.12-3.23	2.01-3.31
36	0.69-1.40	3.64-5.31	0.67-1.38	1.02-1.87	2.20-3.90	1.06-1.93	2.14-3.26	2.03-3.34

**Figura 10** – Valores ecocardiográficos em cães, de acordo com o seu peso (Kg); Modo-M (utilizado para os diâmetros internos do ventrículo esquerdo) (Boon, 2011)

Parameters (units)	Mean±SE	Range
Body weight (kg)	23.83±0.84	18-27
LVIDd (mm)	37.25±1.14	30.4-42.6
LVIDs (mm)	24.56±0.82	21.0-30.8
IVSd (mm)	8.94±0.55	6.0-13.5
IVSs (mm)	13.88±0.80	10.2-15.3
LVPWd (mm)	8.64±0.36	6.2-10.3
LVPWs (mm)	11.67±0.53	9.1-14.6
EDV (ml)	63.64±6.64	36.09-84.12
ESV (ml)	22.01±2.04	14.5-32.27
SV (ml)	39.63±3.36	16.39-51.85
LVFS (%)	34.49±1.93	21.75-45.11
EF (%)	63.64±2.65	45.45-76.95
DE amplitude (mm)	10.35±0.67	6.7-15.6
EF slope (mm/s)	97.17±6.31	66.8-153.2
AC interval (ms)	167.83±10.46	117.0-215.0
EPSS (mm)	5.30±0.26	4.5-7.5
LAD (mm)	22.25±0.55	19.4-26.1
AOD (mm)	23.71±0.48	20.12-25.01

**Figura 11** – Valores ecocardiográficos específicos para cadelas da raça Labrador; Modo-M (utilizado para FS e diâmetros internos do ventrículo esquerdo) (Gugjoo et al., 2014).

Weight (kg)	LA <sub>SAX</sub> Diameter (cm)	LA <sub>LAX</sub> Diameter (cm)	LA <sub>CIRC</sub> (cm)	LA <sub>AREA</sub> (cm <sup>2</sup> )
5	1.7 (1.0, 2.3)	2.1 (1.6, 2.7)	10.2 (7.2, 13.2)	4.2 (0.4, 8.0)
10	2.0 (1.4, 2.6)	2.6 (2.1, 3.2)	11.3 (8.3, 14.2)	5.72 (2.0, 9.5)
15	2.3 (1.7, 2.9)	3.1 (2.5, 3.6)	12.3 (9.4, 15.3)	7.2 (3.5, 10.9)
20	2.6 (2.0, 3.2)	3.4 (2.9, 4.0)	13.4 (10.5, 16.3)	8.7 (5.0, 12.4)
25	2.9 (2.2, 3.5)	3.7 (3.2, 4.3)	14.5 (11.6, 17.4)	10.2 (6.5, 13.9)
30	3.1 (2.5, 3.7)	4.0 (3.5, 4.5)	15.6 (12.6, 18.5)	11.7 (8.0, 15.4)
35	3.3 (2.6, 3.9)	4.2 (3.6, 4.7)	16.6 (13.7, 19.6)	13.2 (9.5, 16.9)
40	3.4 (2.8, 4.2)	4.3 (3.8, 4.8)	17.7 (14.7, 20.7)	14.7 (10.9, 18.5)
45	3.5 (2.9, 4.2)	4.4 (3.8, 4.9)	18.8 (15.7, 21.9)	16.2 (12.3, 20.1)
50	3.6 (2.9, 4.3)	4.4 (3.8, 5.0)	19.9 (16.7, 23.0)	17.7 (13.8, 21.7)
55	3.6 (2.9, 4.4)	5.4 (3.8, 5.1)	20.9 (17.7, 24.2)	19.2 (15.2, 23.3)

**Figura 12** – Valores ecocardiográficos em cães; Modo 2D (utilizado para AE) (Rishniw & Erb, 2000).

LA: Ao Variable	Percentiles					Maximum
	5th	25th	50th	75th	95th	
Diameter, short axis (method 1)	0.86	1.18	1.31	1.42	1.57	1.59
Diameter, long axis (method 2)	1.11	1.53	1.66	1.80	1.99	2.04
Circumference (method 3)	1.51	1.83	1.98	2.20	2.35	2.45
Area (method 4)	1.76	2.20	2.83	3.30	3.68	3.85

**Figura 13** – Valores ecocardiográficos em cães; Modo 2D (utilizado para AE/Ao) (Rishniw & Erb, 2000).

### Simpson's derived method (SDM)

#### SDM-EDVI (mL/m<sup>2</sup>)

Mean ± SD 47.6 ± 8.4

[range] [32.9–69.1]

#### SDM-ESVI (mL/m<sup>2</sup>)

Mean ± SD 15.9 ± 3.9

[range] [9.5–25.4]

#### SDM-EF (%)

Mean ± SD 66.5 ± 6.4

[range] [54.4–75.7]

**Figura 14** – Valores ecocardiográficos em cães; Modo 2D, Método de Simpson Modificado (utilizado para IVVEs, IVVED e FE) (Serres et al., 2008).

$E^a$ (m/s)	A(m/s)	E:A	EDT(ms)	IVRT(s)
$0.75 \pm 0.117$ (0.53-1.06)	$0.49 \pm 0.062$ (0.39-0.67)	$1.53 \pm 0.198$ (1.18-1.89)	$89 \pm 9.2$ (74-108)	$0.080 \pm 0.009$ (0.066-0.100)

**Figura 15** – Valores Ecocardiográficos em cães; Doppler (utilizado para o rácio E/A) (Pereira et al., 2009).