

Avaliação da Efetividade de Diferentes Doses Cumulativas de Doxorubicina para Indução de Modelo de Cardiomiopatia Dilatada em Ratos

Efficacy of Different Cumulative Doses of Doxorubicin in the Induction of a Dilated Cardiomyopathy Model in Rats

Denise Mayumi Tanaka,¹ João Lucas O'Connell,² Camila Godoy Fabricio,¹ Minna Moreira Dias Romano,¹ Erica Carolina Campos,³ Luciano Fonseca Lemos de Oliveira,⁴ André Schmidt,¹ Eduardo Elias Vieira de Carvalho,⁴ Marcus Vinícius Simões¹

Departamento de Clínica Médica – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo,¹ São Paulo, SP – Brasil

Departamento de Cardiologia – Faculdade de Medicina – Universidade Federal de Uberlândia,² Uberlândia, MG – Brasil

Departamento de Fisioterapia – Universidade Federal de Uberlândia,³ Uberlândia, MG – Brasil

Departamento de Fisioterapia Aplicada – Instituto de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Triângulo Mineiro,⁴ Uberaba, MG – Brasil

Resumo

Fundamento: A doxorubicina (DOXO) tem sido utilizada para induzir a cardiomiopatia dilatada (CMD) em modelos experimentais.

Objetivo: Analisar as alterações cardíacas após a infusão de DOXO e definir o protocolo mais eficaz para reproduzir um modelo experimental de CMD.

Métodos: Dividiram-se ratos Wistar machos em 4 grupos e administraram-se doses cumulativas crescentes (2 mg/kg/semana) de DOXO ou solução salina. Os grupos controle (CTRs) receberam solução salina. O grupo D-8 recebeu uma infusão total de 8 mg/kg, o D-12 recebeu 12 mg/kg e o D-16 recebeu 16 mg/kg. Todos os animais foram submetidos a ecocardiograma inicialmente e após o término da infusão. Em seguida, os animais foram submetidos a eutanásia para análise histológica do tecido cardíaco.

Resultados: A taxa de mortalidade foi de 20% (D-8), 30% (D-12) e 67,6% (D-16). A dose de 8 mg/kg não foi associada a redução significativa da FEVE ou a aumento da DDVE. Houve redução significativa da FEVE com a dose de 12 mg/kg e 16 mg/kg em comparação ao CTR 68,3% (DP, 5%) vs 58,4% (DP, 9%), $p < 0,01$, para os grupos CTR-12 vs D-12 e 66,0% (DP, 6%) vs 47,6% (DP, 15%), $p < 0,01$, para os grupos CTR-16 vs D-16. A análise histológica revelou percentual maior de fibrose em D-12 (10,6% DP, 3,3%) e D-16 (9,8% DP, 2,3%) em comparação ao CTR (2,3% DP, 1,0%), $p < 0,001$.

Conclusões: Associou-se a dose de DOXO de 16 mg/kg a alterações cardíacas graves e alta mortalidade. Assim, propomos que a dose de DOXO de 12 mg/kg seja a mais apropriada e eficaz para a indução de CMD e taxa de mortalidade aceitável.

Palavras-chave: Doxorubicina; Cardiotoxicidade; Insuficiência Cardíaca; Disfunção Ventricular Esquerda; Cardiomiopatia Dilatada.

Abstract

Background: Doxorubicin (DOXO) has been used to induce dilated cardiomyopathy (DCM) in experimental models.

Objective: To analyze cardiac changes after DOXO infusion and define the most effective protocol to reproduce an experimental model of DCM.

Methods: Male Wistar rats were divided into 4 groups and received increasing cumulative doses of DOXO (at a rate of 2 mg/kg/week) or saline solution: the control group (CTR) received saline solution, Group D-8 received a total infusion of 8 mg/kg, Group D-12 received 12 mg/kg, and Group D-16 received 6 mg/kg. All animals underwent echocardiography at baseline and after the end of infusion. The animals were then euthanized and cardiac tissue was collected for histological analysis.

Results: Mortality rates were 20% (D-8), 30% (D-12), and 67.6% (D-16). The 8 mg/kg dose was not associated with a significant reduction in left ventricular ejection fraction (LVEF) or an increase in left ventricular end-diastolic diameter (LVEDD). There was significant LVEF impairment with

Correspondência: Marcus Vinícius Simões •

Hospital das Clínicas - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Avenida dos Bandeirantes, 3900, CEP 14.049-900, Ribeirão Preto – São Paulo, SP – Brasil
E-mail: msimoes@fmrp.usp.br

Artigo recebido em 29/06/2022, revisado em 26/08/2022, aceito em 26/08/2022

DOI: <https://doi.org/10.36660/abchf.20220074>

12 mg/kg and 16 mg/kg doses compared to the control ($68.3 \pm 5\%$ vs $58.4 \pm 9\%$, $p < 0.01$, for CTR-12 vs D-12; and $66.0 \pm 6\%$ vs $47.6 \pm 15\%$, $p < 0.01$, for CTR-16 vs D-16). Histological analyses revealed a greater percentage of fibrosis in D-12 ($10.6 \pm 3.3\%$) and D-16 ($9.8 \pm 2.3\%$) compared to CTR ($2.3 \pm 1.0\%$), $p < 0.001$.

Conclusions: The DOXO dose of 16 mg/kg was associated with severe cardiac changes and high mortality. Thus, we propose a DOXO dose of 12 mg/kg as the most appropriate and effective for inducing DCM with an acceptable mortality rate.

Keywords: Doxorubicin; Cardiotoxicity; Heart Failure; Left Ventricular Dysfunction; Dilated Cardiomyopathy.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Introdução

Modelos animais de doenças cardiovasculares são cruciais para investigar os mecanismos fisiopatológicos e testar os efeitos de novas terapias.^{1, 2} Devido à alta prevalência e relevância clínica da síndrome de insuficiência cardíaca (IC), vários estudos descreveram diferentes modelos para a análise dessa condição.³⁻⁵ Neste contexto, os modelos experimentais de IC devem mimetizar as principais alterações fisiopatológicas e morfológicas encontradas em humanos, incluindo remodelação cardíaca, redução da função ventricular, alterações hemodinâmicas, tais como redução do débito cardíaco e aumento da resistência vascular sistêmica, além de alterações histopatológicas. Ao longo das últimas décadas, vários modelos experimentais de IC aguda e crônica com fração de ejeção reduzida foram desenvolvidos para reproduzir diferentes aspectos da cardiomiopatia dilatada (CMD), uma condição que pode ser induzida por diferentes eventos, como sobrecarga de volume,⁶ sobrecarga da pressão de constrição aórtica,⁷ indução de hipertensão arterial,⁸ taquicardiomiopatia,^{9,10} infarto agudo do miocárdio^{11,12} ou uso de drogas cardiotoxícas como propranolol, imipramina e doxorubicina (DOXO).^{13,14}

Entre as drogas usadas, a DOXO, um agente antineoplásico antracíclico, é uma das drogas mais empregadas por investigadores para induzir à CMD e IC.¹⁵⁻²¹ A DOXO está associada à cardiotoxicidade dose-dependente, que pode progredir sequencialmente para IC. Entretanto, há uma grande variação entre os protocolos usados em relação à dose cumulativa total de DOXO, o intervalo entre as doses e a duração necessária para induzir à CMD. Além disso, a eficácia desses modelos na produção de alterações estruturais e funcionais consistentes com aquelas encontradas na CMD humana, embora demonstre ser eficaz ao induzir a uma taxa de mortalidade aceitável, não foi claramente definida.

Portanto, para entender essas descobertas com maior profundidade, o presente estudo visa investigar as alterações morfológicas e funcionais cardíacas induzidas por diferentes doses cumulativas de DOXO em ratos quanto à taxa de mortalidade associada e definir o protocolo de indução mais eficaz e de maior rendimento, que reproduziria um modelo experimental de CMD não isquêmica.

Métodos

Animais

Obtiveram-se ratos machos adultos com peso médio de 250 g no Biotério Geral da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Eles foram

mantidos em um ambiente climaticamente controlado em um ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à água e ração padrão. O número de animais alocados para cada grupo experimental baseou-se em estudos anteriores, com base na expectativa de alta mortalidade, especialmente nos grupos que receberam a infusão de DOXO. Essa expectativa fundamentou-se em uma série de relatórios anteriores na literatura sobre o uso de DOXO, para induzir um modelo experimental de CMD não isquêmica, no qual observou-se mortalidade em torno de 50% a 60%.^{15,22} O Comitê de Ética em Pesquisa aprovou todos os procedimentos experimentais da FMRP (protocolo nº 041/2005).

Produtos químicos

Adriablastin® RD (cloreto de doxorubicina) da Pfizer (Pharmacia, Milão, Itália) foi dissolvido em soro fisiológico (10 mg/100 ml) e administrado por injeção intravenosa. Além disso, para anestesia utilizaram-se injeções intramusculares de cloridrato de ketamina (Vetbrands, Jacarei, SP, Brasil) e xilazina (Calier, Les Franqueses del Vallés, Barcelona, Espanha).

Protocolo experimental

Ao total, incluíram-se 60 animais no protocolo. Os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos experimentais (D-8, D-12 e D-16) e 1 grupo controle (CTR), sem critérios específicos, recebendo infusões intravenosas com doses cumulativas crescentes de 2 mg/kg/semana de DOXO ou solução salina. O grupo D-8 (n=20 animais) recebeu uma infusão total de 8 mg/kg durante 4 semanas, o D-12 (n=30 animais) recebeu uma infusão total de 12 mg/kg durante 6 semanas, e o D-16 (n=28 animais) recebeu uma infusão total de 16 mg/kg durante 8 semanas. O CTR consistia de 8 animais pareados por idade que receberam o mesmo volume de solução salina durante 8 semanas.

Todos os animais foram submetidos no início e 2 semanas após o final da infusão a avaliação *in vivo* da função ventricular por ecocardiograma. Em seguida, os animais foram submetidos a eutanásia para avaliação histológica e análise quantitativa das áreas de colágeno.

Os animais foram mantidos em gaiolas com o mesmo grupo e incluíam apenas animais machos. Todos foram submetidos às mesmas condições de estresse e à mesma ordem de medidas, para minimizar potenciais confundidores. Todos os procedimentos foram realizados sob anestesia para reduzir o estresse e a dor. Não houve restrição à alimentação e à água.

Avaliação ecocardiográfica da remodelação e função ventricular

A função cardíaca foi avaliada por ecocardiografia 2D inicialmente e após o tratamento com doxorrubicina, como descrito anteriormente.²³

Após a sedação com ketamina e xilazina (20 e 8 mg/kg), o ecocardiograma foi registrado com o sistema de ecocardiografia bidimensional de alta resolução Sonos 5500 Philips (Andover, MA, EUA), com transdutor linear de alta frequência de 15 MHz. Empregando-se a janela paraesternal para obter imagens de eixo longo e curto do VE a nível papilar, utilizaram-se imagens em modo M para medir o septo interventricular, a espessura da parede posterior do VE e os diâmetros diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) da extremidade do VE. O DDVE foi medido na dimensão diastólica ventricular máxima e o DSVE foi obtido durante o movimento interno máximo do septo e da parede posterior.

A FEVE foi calculada pelo método bidimensional no qual mediu-se a área bidimensional de encurtamento do VE a partir das vistas apical, subcostal e, particularmente, as vistas do eixo curto. Além disso, as imagens das áreas endocárdicas do VE em diástole e sístole foram digitalizadas e medidas *offline*. Determinou-se a área de encurtamento pela fórmula $FE(2D) = (AD-AS)/AD$, na qual AD e AS são áreas de diástole e sístole, respectivamente.

As imagens foram registradas por um ecocardiografista experiente no trabalho de laboratório com animais de pequeno porte, que era indiferente quanto ao grupo ao qual os animais pertenciam, para a análise *offline* ao final do estudo.

Todas as medições representaram a média de 5 ciclos cardíacos consecutivos usando a mesma posição e ângulo do transdutor no mesmo quadro de imagem congelada. Mediu-se o intervalo entre 2 ciclos cardíacos consecutivos para calcular a frequência cardíaca.

Histopatologia - Colheita e preparação dos corações

Utilizaram-se 6 animais escolhidos aleatoriamente de cada grupo para a análise histopatológica. Os corações foram rapidamente retirados, enxaguados em solução salina gelada a 0,9% e fixados como um todo por imersão em formalina com tampão de fosfato a 10% durante 24 horas a 4°C, para estudo histológico. Ambos os ventrículos de cada coração foram isolados e cortados em 2 fragmentos pela seção coronal ventricular média. Cada bloco foi cortado sequencialmente na mesma direção a uma espessura apropriada de 4-7 µm para cada coloração, sendo as seções coradas com hematoxilina-eosina (HE) e vermelho picrossírius.

Quantificação de colágeno

As seções coradas com vermelho picrossírius foram usadas para quantificar a fração de volume de colágeno intersticial usando o programa Leica Qwin, versão 3.2.0 (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, Reino Unido) juntamente com um microscópio Leica DMR (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Suíça), uma câmera de vídeo (Leica DC300F, Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Suíça) e um computador online.

Selecionaram-se 20 campos de alta ampliação (×400) da parede livre do VE em cada animal, e os valores da fração de volume de colágeno intersticial foram expressos como percentual da área total do VE.

Análise estatística

Os dados das variáveis contínuas são reportados como média (DP), e as variáveis nominais são reportadas como frequência absoluta (n) e relativa (%). Os dados foram analisados utilizando o software estatístico GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Utilizou-se o teste Kolmogorov-Smirnov para verificar a distribuição Gaussiana das variáveis. Para comparar os resultados entre os grupos experimentais e controle, utilizou-se o teste *t* de Student. Utilizou-se o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn, para avaliar as diferenças entre os escores médios obtidos na quantificação da fibrose. Na comparação das distribuições de frequência utilizou-se o teste exato de Fischer. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$, bicaudal em todas as análises.

Resultados

Mortalidade

Após 2 semanas do término do período de infusão dos fármacos, 4 (20%) dos 20 animais que haviam iniciado o experimento morreram no grupo D-8. A taxa de mortalidade foi de 30% (9/30 animais) no grupo D-12, enquanto a mortalidade foi extremamente elevada, 67,6% (19/28 animais) no grupo D-16. No CTR, nenhum (0%) animal morreu. Detectou-se diferença significativa na mortalidade somente entre o grupo D-16 e seu CTR ($p < 0,001$) (Figura 1).

Peso corporal

Observou-se redução significativa do peso corporal em relação aos respectivos CTR nos animais do grupo D-8 368 g (DP, 32 g) vs 444 g (DP, 19 g), $p < 0,01$, grupo D-12 366 g (DP, 30 g) vs 505 g (DP, 23 g), $p < 0,0001$ e grupo D-16 331 g (DP, 21 g) vs 534 g (DP, 29 g), $p < 0,0001$. Essa diferença foi

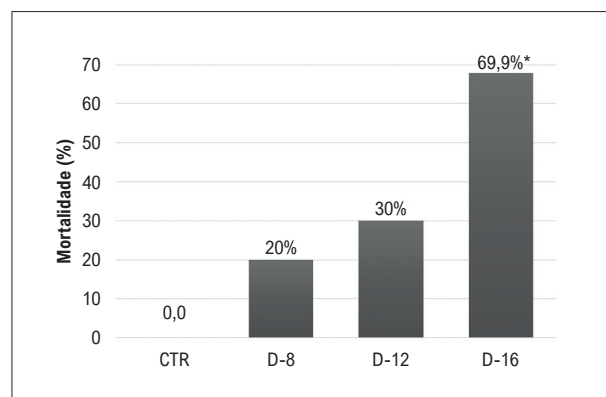


Figura 1 – Gráfico de barras representando a taxa de mortalidade observada nos grupos analisados (* $p < 0,001$ – Teste exato de Fisher).

Artigo Original

progressivamente mais evidente com o aumento da dose de DOXO, já que os animais dos CTR pesavam, em média, 20%, 38% e 61% a mais do que os animais dos grupos D-8, D-12 e D-16, respectivamente.

Avaliação funcional e estrutural do VE por ecocardiografia

Avaliação basal: Os dados da ecocardiografia basal são apresentados na tabela 1. Não se detectou diferença

Tabela 1 – Parâmetros basais de ecocardiografia avaliados nos 86 animais de estudo

	CTR (n=8)	D-8 (n=20)	D-12 (n=30)	D-16 (n=28)
Peso (g)	251,5 (18,3)	248,1 (17,1)	246,1 (15,5)	253,3 (8,9)
DDVE (mm)	6,0 (0,7)	5,8 (0,4)	5,6 (0,6)	5,9 (0,7)
DSVE (mm)	3,1 (0,8)	2,8 (0,5)	2,7 (0,4)	3,0 (1,1)
espessura PS (mm)	1,5 (0,2)	1,6 (0,2)	1,6 (0,1)	1,4 (0,2)
espessura PP (mm)	1,5 (0,2)	1,6 (0,3)	1,6 (0,2)	1,5 (0,2)
massa do VE (g)	1,1 (0,1)	1,0 (0,1)	1,0 (0,1)	1,1 (0,1)
FEVE 2D (%)	72,2 (9,9)	72,7 (4,9)	73,5 (7,5)	72,2 (6,5)
Frequência cardíaca (bpm)	289 (18,8)	317 (48,9)	316 (26,3)	295 (34,7)

DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; espessura PP: espessura da parede posterior na diástole máxima; espessura PS: espessura da parede septal na diástole máxima; FEVE 2D: fração de ejeção determinada pelo método de encurtamento fracionário do VE. ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla Tukey-Kramer.

significativa nos parâmetros da ecocardiografia basal entre os grupos de estudo ($p > 0,05$) antes da administração de DOXO.

Avaliação após a infusão de doxorrubicina: Os dados de ecocardiografia obtidos após a infusão de DOXO são apresentados na tabela 2.

O DSVE foi maior no grupo D-16 em comparação com seu CTR, 5,1 mm (DP, 0,8 mm) vs 4,3 mm (DP, 0,5 mm), $p < 0,05$. Essa variável não apresentou diferença nos demais grupos experimentais. O DSVE dos animais dos grupos D-8, D-12 e D-16 foi semelhante ao de seus CTRs, $p > 0,05$.

Os resultados da FEVE obtidos pelo método bidimensional revelaram que os grupos D-12 e D-16 apresentaram redução significativa da função sistólica do VE em comparação com seus respectivos CTRs: 68,3% (DP, 5%) vs 58,4% (DP, 9%), $p < 0,01$, para o grupo CTR-12 vs D-12 e 66,0% (DP, 6%) vs 47,6% (DP, 15); ($p < 0,01$), para o grupo CTR-16 vs D-16. Assim, pode-se observar redução de 14,5% da FEVE no grupo D-12 e redução de 27,9% no grupo D-16. Não se detectou diminuição da FEVE no grupo D-8, $p > 0,05$. (Figura 2).

A frequência cardíaca observada durante a ecocardiografia foi significativamente menor entre os animais do grupo D-16 227 bpm (DP, 30 bpm) do que entre os do CTR 272 bpm (DP, 18 bpm), $p < 0,01$. Esse parâmetro não apresentou diferença nos demais grupos experimentais.

A massa estimada pelo ecocardiograma do VE foi significativamente reduzida nos animais dos grupos D-12 e D-16 em comparação com os dos CTRs, $p < 0,05$. Não houve diferença na massa estimada do VE entre os animais do grupo D-8 e os do CTR.

Análise comparativa dos diferentes grupos que receberam doxorrubicina

A análise comparativa dos grupos que recebem diferentes doses de DOXO revelou uma diminuição progressiva da FEVE (FEVE 2D) entre os grupos D-8 e D-12 ($p < 0,05$), D-8 e D-16 ($p < 0,001$) e D-12 e D-16 ($p < 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2 – Mortalidade, peso e parâmetros ecocardiográficos dos 58 animais sobreviventes, de acordo com o grupo experimental

	CTR-8 (n=8)	D-8 (n=16)	CTR-12 (n=8)	D-12 (n=21)	CTR-16 (n=8)	D-16 (n=13)
Mortalidade	0%	20%	0%	30%	0%	67,9% *
Peso (g)	444 (19)	368 (32) *	505 (23)	366 (30) *	534 (29)	331 (21) *
DDVE (mm)	7,1 (0,9)	6,7 (0,7)	8,1 (0,8)	7,6 (0,7) †	8,1 (0,4)	7,7 (0,8) †
DSVE (mm)	3,5 (0,8)	3,6 (0,5)	4,2 (1,1)	4,5 (0,7) †	4,3 (0,5)	5,1 (0,8) *††
espessura PS (mm)	1,5 (0,2)	1,5 (0,1)	1,7 (0,2)	1,6 (0,2)	1,6 (0,1)	1,5 (0,1)
espessura PP (mm)	1,5 (0,2)	1,6 (0,3)	1,6 (0,3)	1,5 (0,1)	1,5 (0,1)	1,4 (0,2) †
massa do VE (g)	1,2 (0,2)	1,2 (0,3)	1,5 (0,2)	1,3 (0,2) *	1,3 (0,1)	1,2 (0,1)
FEVE 2D (%)	70 (8)	66,7 (5)	68,3 (5)	58,4 (9) *†	66,0 (6)	47,6 (15) ††*
Frequência cardíaca (bpm)	278 (22)	258 (40)	271 (21)	251 (27)	272 (18)	227 (30) ††*

DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; espessura PP: espessura da parede posterior na diástole máxima; espessura PS: espessura da parede septal na diástole máxima; FEVE 2D: fração de ejeção determinada pelo método de encurtamento fracionário do VE. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle, de acordo com a idade (teste t não pareado); † $p < 0,05$ comparado ao grupo D-8 (ANOVA seguido do teste de Tukey); †† $p < 0,05$ comparado ao grupo D-12 (ANOVA seguido do teste de Tukey).

Análise quantitativa das alterações histológicas por microscopia óptica

A análise histopatológica do coração dos animais dos CTRs corados com HE não revelou nenhuma alteração patológica, enquanto que os corações dos animais infundidos com DOXO mostraram lesão de miócitos com redução e degeneração das fibras miocárdicas e diminuição significativa das miofibrilas, com perda da organização miofibrilar, fibrose periarteriolar no miocárdio e interstícios, associada à deposição de colágeno (Figura 3). As alterações detectadas no grupo D-8 foram menos pronunciadas que em D-12 e D-16.

Quantificação da fibrose

Para a análise quantitativa de fibrose, as amostras foram coradas com vermelho picrossirius. Observou-se um percentual maior de fibrose nos grupos D-8 6,0% (DP, 2,3%), D-12 10,6% (DP, 3,3%) e D-16 9,8%, (DP, 2,3%) em comparação com o CTR 2,3% (DP, 1,0%), $p < 0,001$. Além disso, os grupos D-12 e D-16 apresentaram área de fibrose maior do que o grupo D-8, $p < 0,001$, mas não diferiram um do outro (Figura 4).

Discussão

No presente estudo, investigamos a eficácia de diferentes doses cumulativas de DOXO na indução de alterações funcionais e cardíacas, equilibrando esses resultados em relação às taxas de mortalidade intrinsecamente associadas a doses cumulativas mais altas, a fim de definir a dose de DOXO com a melhor eficácia. Os principais resultados mostraram redução significativa da função sistólica do VE a partir da dose cumulativa de 12 mg/kg de DOXO, ocorrendo uma disfunção maior com a dose cumulativa de 16 mg/kg, e nenhuma redução significativa da FEVE com a dose de 8 mg/kg. Além disso, observamos aumento significativo da fibrose miocárdica em comparação ao CTR em todas as 3 doses cumulativas testadas, observando-se maior grau de fibrose nos grupos D-12 e D-16, os quais exibiram graus semelhantes de fibrose. Verificou-se aumento progressivo da mortalidade associada a doses mais elevadas, com um índice excessivo (67,9%) na dose cumulativa de 16 mg/kg. Analisados em conjunto, esses resultados sugerem que a dose de DOXO com a melhor eficácia para a indução de CMD em ratos foi a de 12 mg/kg.

Taxas de mortalidade

A alta taxa de mortalidade observada no presente estudo coincide com os valores relatados em estudos anteriores, variando de 36% a 82%.^{15,18,24,25} Estudos anteriores mostraram que variações nas taxas de mortalidade estão relacionadas a 3 razões principais: dose total administrada, duração do período de infusão e tempo de observação. A mortalidade aumenta proporcionalmente à dose maior, menor período de administração e maior período de observação.^{15, 24, 26}

Além da lesão miocárdica, altas doses cumulativas de DOXO produzem toxicidade renal, da medula óssea e gastrointestinal, que podem contribuir para o aumento das taxas de mortalidade devido à indução de hipercalemia, hipervolemia, anemia, diarreia e desnutrição.^{24,27} Além de

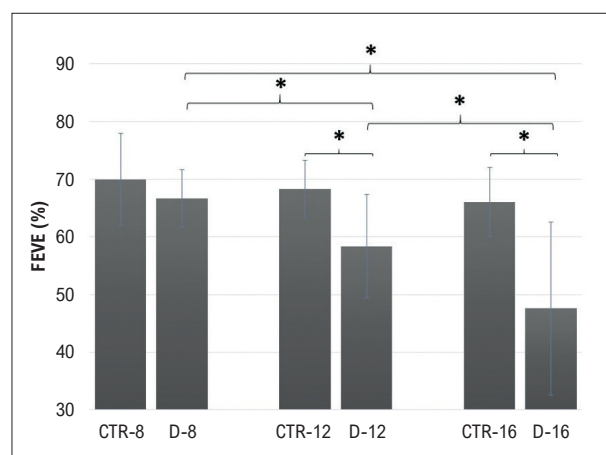


Figura 2 – Gráfico de barras representando os valores médios da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) obtidos nos grupos de estudo. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle, de acordo com a idade (teste t não pareado), e comparação entre os grupos (ANOVA seguido do teste de Tukey).

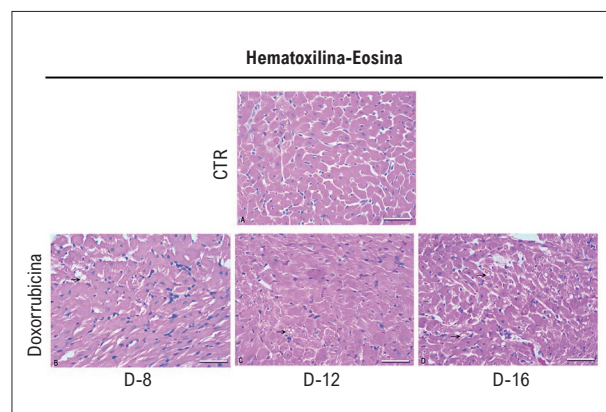


Figura 3 – Seções histológicas representativas coradas com HE dos grupos controle (A) e doxorubicina (D-8, D-12 e D-16). Observam-se perda e degeneração das fibras miocárdicas nos animais após a infusão de doxorubicina (DOXO) (painéis B, C e D), com redução significativa das miofibrilas, edema e degeneração vacuolar (marcado por setas). Essas alterações são mais pronunciadas com o incremento das doses cumulativas de DOXO.

perder peso e massa muscular, os animais tornam-se fracos e incapazes de se alimentar adequadamente, resultando em fraqueza muscular progressiva e generalizada, que pode contribuir para o aumento da mortalidade. No presente estudo, os animais dos grupos D-12 e D-16 apresentaram diferenças significativas no aspecto geral e no peso em comparação com seus respectivos CTRs, corroborando indiretamente a presença desses mecanismos debilitantes. Essas alterações também foram descritas por outros autores.^{15,22,24,27}

Alterações estruturais e funcionais cardíacas *in vivo*

Em geral, realizaram-se estudos utilizando DOXO para a investigação de lesões histopatológicas²⁸ e estudo da cardiotoxicidade do fármaco,²⁹ com ênfase principalmente

Artigo Original

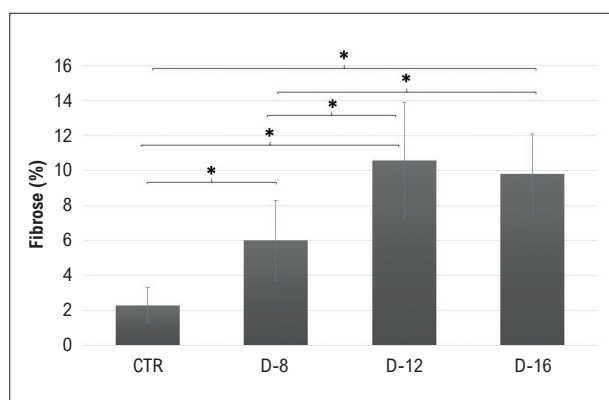


Figura 4 – Gráfico de barras representando os valores médios de fibrose obtidos nos grupos de estudo. * $p < 0,05$ (ANOVA seguido do teste de Tukey).

em alterações metabólicas e estresse oxidativo desse modelo,^{15,30-32} e não na avaliação do grau de disfunção ventricular *in vivo* ou mortalidade. Assim, o objetivo desses modelos não era caracterizar um modelo de IC ou CMD. Observamos, pois, uma ampla variedade de protocolos na literatura. Nosso estudo pretendia descrever um protocolo que fosse adequado, eficaz e de melhor rendimento, reproduzindo um modelo experimental de CMD não isquêmica baseado em alterações estruturais e funcionais *in vivo*, mas com taxas de mortalidade aceitáveis.

Ressaltamos que, neste estudo, escolhemos a infusão intravenosa de DOXO em doses cumulativas crescentes. Em um estudo anterior com ratos, O'Connel et al.³³ compararam 2 protocolos de tempo de infusão de DOXO, um curto e um longo, para a indução de CMD. Neste estudo, observamos que ambos os protocolos geraram lesões histológicas similares, embora apenas a infusão prolongada estivesse associada a alterações estruturais e funcionais similares àsquelas detectadas na CMD clínica. Essas descobertas respaldam a ideia de que a infusão prolongada é mais eficaz que a infusão curta quando o desfecho primário é a indução de alterações estruturais e funcionais.³³

No presente estudo, observamos uma clara correlação entre a dose cumulativa de DOXO e o grau de disfunção ventricular que ocorre progressivamente, a partir da dose cumulativa de 12 mg/kg. Nossos resultados mostram que os animais que receberam uma dose cumulativa de 16 mg/kg apresentaram alterações funcionais e estruturais cardíacas mais marcantes, avaliadas por ecocardiograma bidimensional *in vivo*, em comparação com seus respectivos CTRs, caracterizados principalmente por um aumento do DSVE, redução da FEVE e da massa estimada do VE. No entanto, as taxas de mortalidade para esse grupo foram excessivas, uma vez que mais de dois terços dos animais não sobreviveram até 2 semanas após a indução da CMD.

Por outro lado, a dose cumulativa de 12 mg/kg foi associada a alterações estruturais que não foram tão acentuadas quanto as observadas com a dose de 16 mg/kg, mas foi suficiente para causar redução significativa da FEVE e aumento da fibrose miocárdica. Além disso, a taxa de mortalidade para o grupo

D-12 (30%) foi aceitável, levando-nos a concluir que esse protocolo poderia ser adequado para a indução de disfunção ventricular com o uso de DOXO em ratos.

Nossos resultados corroboram os de estudos anteriores, que sugerem que doses cumulativas acima de 12 mg/kg estão associadas a aumento da mortalidade.^{18,22,34} Os resultados obtidos por Spivak et al.,³⁴ usando um tempo de dosagem mais curto de DOXO, sugeriram que doses cumulativas acima de 12 mg/kg estão associadas a taxa de mortalidade superior a 40%, sendo assim inadequada para pesquisas *in vivo* sobre IC.³⁴ Com efeito, o estudo de Schwarz et al.²² demonstrou que doses maiores, como 25 mg/kg, durante um período de 10 semanas, estão associadas a maior grau de disfunção ventricular, mas com altas taxas de mortalidade, que chegam a 52%.²²

Alterações histopatológicas

No presente estudo, observamos diferenças morfológicas nítidas entre os grupos que receberam DOXO. As lesões foram as tipicamente relatadas na CMD induzida por DOXO em humanos³⁵ e em outros modelos animais,³⁶⁻³⁸ ou seja, predominantemente danos aos miócitos, com perda e degeneração das fibras miocárdicas, redução significativa das miofibrilas, fibrose e deposição de colágeno, além de edema e vacuolização cardiomiocitária, edema intracelular e desorganização das miofibrilas. Observamos que a deposição de colágeno foi semelhante à relatada em estudos anteriores que utilizavam esse modelo experimental.^{23,39} A dose cumulativa de DOXO associada a danos histológicos significativos em nosso estudo foi semelhante aos achados relatados em outros, que sugeriram uma dose de 15 mg/kg como a mais eficaz na indução de lesões histopatológicas.⁴⁰

Deve-se ressaltar que embora a disfunção ventricular tenha sido mais acentuada na dose de 16 mg/kg, o grau de lesão tecidual representada pela fibrose foi semelhante para os grupos D-12 e D-16, sugerindo possível dissociação entre esses 2 parâmetros nessa faixa de doses cumulativas de DOXO. Esses resultados confirmam evidências anteriores obtidas por nosso grupo de pesquisa, revelando relativa dissociação entre o grau de lesão tecidual e a intensidade da disfunção ventricular esquerda com o uso de diferentes regimes de infusão de DOXO.³³

Os resultados atuais mostram que o modelo de indução usando uma dose cumulativa total de 16 mg/kg de DOXO, com 8 injeções semanais de 2 mg/kg, é o que melhor induz a alterações morfológicas e funcionais em animais, embora implique em mortalidade elevada e eticamente inaceitável, o que desencoraja o uso desse protocolo. Além disso, a dificuldade em manter um modelo altamente agressivo de disfunção ventricular pelo período mínimo de tempo suficiente para a avaliação de uma determinada intervenção terapêutica é um fator relevante na escolha do protocolo mais eficiente.

Conclusões

Nossos resultados indicam que o modelo de 6 injeções semanais de 2 mg/kg de DOXO, com dose cumulativa de 12 mg/kg, apresenta a melhor eficácia para indução

de CMD, resultando em remodelamento significativo do VE, comprometimento da função sistólica e lesão tecidual associada a taxas aceitáveis de mortalidade.

Agradecimentos

Esse estudo foi financiado pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Protocolo: 2014/07722-4) e pela Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas (FAEPA).

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Tanaka DM, O'Connell JL, Schmidt A, Simões MV; Obtenção de dados: O'Connell JL, Fabricio CG, Romano MMD, Campos EC, Oliveira LFL, Carvalho EEV; Análise e interpretação dos dados: Tanaka DM, O'Connell JL, Fabricio CG, Romano MMD, Campos EC, Oliveira LFL, Schmidt A, Carvalho EEV, Simões MV; Análise estatística: Tanaka DM, Simões MV; Obtenção de financiamento: Simões MV; Redação do manuscrito: Tanaka

DM, Campos EC; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Tanaka DM, O'Connell JL, Fabricio CG, Romano MMD, Oliveira LFL, Schmidt A, Carvalho EEV, Simões MV.

Potencial conflito de interesse

Não há conflito com o presente artigo

Fontes de financiamento

O presente estudo foi parcialmente financiado por Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Protocolo: 2014/07722-4) e Fundação de Apoio ao Ensino Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas.

Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de tese de doutorado de João Lucas O'Connell pela Universidade de São Paulo

Referências

- Morais SB, Silva LE, Lатарo RM, Silva CA, Oliveira LF, Carvalho EE, et al. Mesenchymal Stem Cells Improve Heart Rate Variability and Baroreflex Sensitivity in Rats with Chronic Heart Failure. *Stem Cells Dev.* 2015;24(18):2181-92. doi: 10.1089/scd.2014.0573.
- Iseoka H, Miyagawa S, Saito A, Harada A, Sawa Y. Role and Therapeutic Effects of Skeletal Muscle-Derived Non-Myogenic Cells in a Rat Myocardial Infarction Model. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):69. doi: 10.1186/s13287-020-1582-5.
- Sorrentino A, Steinhorn B, Troncone L, Saravi SSS, Badole S, Eroglu E, et al. Reversal of Heart Failure in a Chemogenetic Model of Persistent Cardiac Redox Stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2019;317(3):H617-H626. doi: 10.1152/ajpheart.00177.2019.
- Monnet E, Chachques JC. Animal Models of Heart Failure: What is New? *Ann Thorac Surg.* 2005;79(4):1445-53. doi: 10.1016/j.athoracsur.2004.04.002.
- Rai V, Sharma P, Agrawal S, Agrawal DK. Relevance of Mouse Models of Cardiac Fibrosis and Hypertrophy in Cardiac Research. *Mol Cell Biochem.* 2017;424(1-2):123-45. doi: 10.1007/s11010-016-2849-0.
- Tessier D, Lajos P, Braunberger E, Pouchelon JL, Carpentier A, Chachques JC, et al. Induction of Chronic Cardiac Insufficiency by Arteriovenous Fistula and Doxorubicin Administration. *J Card Surg.* 2003;18(4):307-11. doi: 10.1046/j.1540-8191.2003.02044.x.
- Zile MR, Brutsaert DL. New Concepts in Diastolic Dysfunction and Diastolic Heart Failure: Part II: Causal Mechanisms and Treatment. *Circulation.* 2002;105(12):1503-8. doi: 10.1161/hc1202.105290.
- Li Z, Bing OH, Long X, Robinson KG, Lakatta EG. Increased Cardiomyocyte Apoptosis During the Transition to Heart Failure in the Spontaneously Hypertensive Rat. *Am J Physiol.* 1997;272(5 Pt 2):H2313-9. doi: 10.1152/ajpheart.1997.272.5.H2313.
- Shinbane JS, Wood MA, Jensen DN, Ellenbogen KA, Fitzpatrick AP, Scheinman MM. Tachycardia-Induced Cardiomyopathy: A Review of Animal Models and Clinical Studies. *J Am Coll Cardiol.* 1997;29(4):709-15. doi: 10.1016/s0735-1097(96)00592-x.
- Moe GW, Albernaz A, Naik GO, Kirchengast M, Stewart DJ. Beneficial Effects of Long-Term Selective Endothelin Type A Receptor Blockade in Canine Experimental Heart Failure. *Cardiovasc Res.* 1998;39(3):571-9. doi: 10.1016/s0008-6363(98)00169-2.
- Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. Experimental Observations and Clinical Implications. *Circulation.* 1990;81(4):1161-72. doi: 10.1161/01.cir.81.4.1161.
- Nishina T, Miwa S, Yuasa S, Nishimura K, Komeda M. A Rat Model of Ischaemic or Dilated Cardiomyopathy for Investigating Left Ventricular Repair Surgery. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2002;29(8):728-30. doi: 10.1046/j.1440-1681.2002.03708.x.
- Ikeda H, Imaizumi T. Prognosis of Hypertrophic and Dilated Cardiomyopathy. *Nihon Rinsho.* 2000;58(1):86-92.
- Ikeda Y, Ross Jr. Models of Dilated Cardiomyopathy in the Mouse and the Hamster. *Curr Opin Cardiol.* 2000;15(3):197-201. doi: 10.1097/00001573-200005000-00013.
- Kawasaki N, Lee JD, Shimizu H, Ishii Y, Ueda T. Cardiac Energy Metabolism at Several Stages of Adriamycin-Induced Heart Failure in Rats. *Int J Cardiol.* 1996;55(3):217-25. doi: 10.1016/0167-5273(96)02672-1.
- Poua P, Bonoron-Adèle S, Gouverneur C, Tariosse L, Besse P, Robert J. Evaluation of Anthracycline Cardiotoxicity with the Model of Isolated, Perfused Rat Heart: Comparison of New Analogues versus Doxorubicin. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1995;35(3):257-61. doi: 10.1007/BF00686558.
- Richard C, Lauzier B, Delemasure S, Talbot S, Ghibu S, Collin B, et al. Effects of Angiotensin-1 Converting Enzyme Inhibition on Oxidative Stress and Bradykinin Receptor Expression During Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy in Rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2008;52(3):278-85. doi: 10.1097/FJC.0b013e3181865f28.
- Teraoka K, Hirano M, Yamaguchi K, Yamashina A. Progressive Cardiac Dysfunction in Adriamycin-Induced Cardiomyopathy Rats. *Eur J Heart Fail.* 2000;2(4):373-8. doi: 10.1016/s1388-9842(00)00111-2.
- Tokudome T, Mizushige K, Noma T, Manabe K, Murakami K, Tsuji T, et al. Prevention of Doxorubicin (Adriamycin)-Induced Cardiomyopathy by Simultaneous Administration of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Assessed by Acoustic Densitometry. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000;36(3):361-8. doi: 10.1097/00005344-200009000-00012.
- Robert J. Long-Term and Short-Term Models for Studying Anthracycline Cardiotoxicity and Protectors. *Cardiovasc Toxicol.* 2007;7(2):135-9. doi: 10.1007/s12012-007-0022-4.

21. Talavera J, Giraldo A, Fernández-Del-Palacio MJ, García-Nicolás O, Seva J, Brooks G, et al. An Upgrade on the Rabbit Model of Anthracycline-Induced Cardiomyopathy: Shorter Protocol, Reduced Mortality, and Higher Incidence of Overt Dilated Cardiomyopathy. *Biomed Res Int*. 2015;2015:465342. doi: 10.1155/2015/465342.
22. Schwarz ER, Pollick C, Dow J, Patterson M, Birnbaum Y, Kloner RA. A Small Animal Model of Non-Ischemic Cardiomyopathy and its Evaluation by Transthoracic Echocardiography. *Cardiovasc Res*. 1998;39(1):216-23. doi: 10.1016/s0008-6363(98)00009-1.
23. Romano MM, Pazin-Filho A, O'Connell JL, Simões MV, Schmidt A, Campos EC, et al. Early Detection of Doxorubicin Myocardial Injury by Ultrasonic Tissue Characterization in an Experimental Animal Model. *Cardiovasc Ultrasound*. 2012;10:40. doi: 10.1186/1476-7120-10-40.
24. Hayward R, Hydock DS. Doxorubicin Cardiotoxicity in the Rat: An In Vivo Characterization. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2007;46(4):20-32.
25. Ambler GR, Johnston BM, Maxwell L, Gavin JB, Gluckman PD. Improvement of Doxorubicin Induced Cardiomyopathy in Rats Treated with Insulin-Like Growth Factor I. *Cardiovasc Res*. 1993;27(7):1368-73. doi: 10.1093/cvr/27.7.1368.
26. Hole LD, Larsen TH, Fossan KO, Limé F, Schjøtt J. A Short-Time Model to Study Relevant Indices of Cardiotoxicity of Doxorubicin in the Rat. *Toxicol Mech Methods*. 2013;23(6):412-8. doi: 10.3109/15376516.2013.773391.
27. Jensen RA, Acton EM, Peters JH. Doxorubicin Cardiotoxicity in the Rat: Comparison of Electrocardiogram, Transmembrane Potential, and Structural Effects. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1984;6(1):186-200.
28. Lushnikova EL, Klinnikova MG, Molodykh OP, Nepomnyashchikh LM. Morphological Manifestations of Heart Remodeling in Anthracycline-Induced Dilated Cardiomyopathy. *Bull Exp Biol Med*. 2004;138(6):607-12. doi: 10.1007/s10517-005-0138-0.
29. Robert J. Preclinical Assessment of Anthracycline Cardiotoxicity in Laboratory Animals: Predictiveness and Pitfalls. *Cell Biol Toxicol*. 2007;23(1):27-37. doi: 10.1007/s10565-006-0142-9.
30. Carvalho RA, Sousa RP, Cadete VJ, Lopaschuk GD, Palmeira CM, Bjork JA, et al. Metabolic Remodeling Associated with Subchronic Doxorubicin Cardiomyopathy. *Toxicology*. 2010;270(2-3):92-8. doi: 10.1016/j.tox.2010.01.019.
31. Wu R, Wang HL, Yu HL, Cui XH, Xu MT, Xu X, et al. Doxorubicin Toxicity Changes Myocardial Energy Metabolism in Rats. *Chem Biol Interact*. 2016;244:149-58. doi: 10.1016/j.cbi.2015.12.010.
32. Carvalho FS, Burgeiro A, Garcia R, Moreno AJ, Carvalho RA, Oliveira PJ. Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: from Bioenergetic Failure and Cell Death to Cardiomyopathy. *Med Res Rev*. 2014;34(1):106-35. doi: 10.1002/med.21280.
33. O'Connell JL, Romano MM, Pulici ECC, Carvalho EE, Souza FR, Tanaka DM, et al. Short-Term and Long-Term Models of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy in Rats: A Comparison of Functional and Histopathological Changes. *Exp Toxicol Pathol*. 2017;69(4):213-9. doi: 10.1016/j.etp.2017.01.004.
34. Spivak M, Bubnov R, Yemets I, Lazarenko L, Timoshok N, Vorobieva A, et al. Doxorubicin Dose for Congestive Heart Failure Modeling and the Use of General Ultrasound Equipment for Evaluation in Rats. Longitudinal in Vivo Study. *Med Ultrason*. 2013;15(1):23-8. doi: 10.11152/mu.2013.2066.151.mst1ddc2.
35. Billingham ME. Some Recent Advances in Cardiac Pathology. *Hum Pathol*. 1979;10(4):367-86. doi: 10.1016/s0046-8177(79)80043-x.
36. Saad SY, Najjar TA, Al-Rikabi AC. The Preventive Role of Deferoxamine Against Acute Doxorubicin-Induced Cardiac, Renal and Hepatic Toxicity in Rats. *Pharmacol Res*. 2001;43(3):211-8. doi: 10.1006/phrs.2000.0769.
37. Yagmurca M, Fadillioglu E, Erdogan H, Ucar M, Sogut S, Irmak MK. Erdosteine Prevents Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Rats. *Pharmacol Res*. 2003;48(4):377-82. doi: 10.1016/s1043-6618(03)00185-3.
38. Rea D, Coppola C, Barbieri A, Monti MG, Misso G, Palma G, et al. Strain Analysis in the Assessment of a Mouse Model of Cardiotoxicity due to Chemotherapy: Sample for Preclinical Research. *In Vivo*. 2016;30(3):279-90.
39. Migrino RQ, Aggarwal D, Konorev E, et al. Early detection of doxorubicin cardiomyopathy using two-dimensional strain echocardiography. *Ultrasound Med Biol* 2008; 34: 208-214. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2007.07.018.
40. Herman EH, Ferrans VJ. Preclinical Animal Models of Cardiac Protection from Anthracycline-Induced Cardiotoxicity. *Semin Oncol*. 1998;25(4 Suppl 10):15-21.

