

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO CARDIOPROTETOR DO CARVEDILOL EM CÃES
SUBMETIDOS À QUIMIOTERAPIA COM DOXORRUBICINA**

ELOISA HELENA MOREIRA PINO

Porto Alegre

2019

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO CARDIOPROTETOR DO CARVEDILOL EM CÃES
SUBMETIDOS À QUIMIOTERAPIA COM DOXORRUBICINA**

Eloisa Helena Moreira Pino

**Dissertação apresentada como requisito
parcial para a obtenção do grau de mestre
em Ciências Veterinárias.**

Orientador: Dr. Daniel Guimarães Gerardi

Coorientador: Dr. Cláudio Wageck Canal

Porto Alegre

2019

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

CIP - Catalogação na Publicação

Moreira Pino, Eloisa Helena
Avaliação do efeito cardioprotetor do carvedilol em
cães submetidos à quimioterapia com doxorubicina /
Eloisa Helena Moreira Pino. -- 2019.
62 f.
Orientador: Daniel Guimarães Gerardi.

Coorientador: Cláudio Wageck Canal.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto
Alegre, BR-RS, 2019.

1. Cardiotoxicidade. 2. Antraciclinas. 3. Beta
bloqueador. 4. Canino. 5. Estresse oxidativo. I.
Guimarães Gerardi, Daniel, orient. II. Wageck Canal,
Cláudio, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

A Deus e a minha família por ter chegado aonde cheguei, minha mãe Edesita e minhas irmãs Maria Tereza e Ana Carolina.

Ao meu marido Matheus pelo companheirismo, paciência e apoio para tudo em todas as horas, sendo um grande professor e entusiasta na área da pesquisa.

Ao professor Cláudio Canal por acreditar no meu potencial e pelo suporte nesses anos de mestrado.

Ao meu orientador Daniel Gerardi pela empatia, amizade, confiança e aprendizados nesses anos.

À professora Anelise pela ajuda na divisão dos comprimidos. Isabella e Keylla pelo companheirismo e suporte em cada avaliação. E Gabriela Ledur pelos momentos de auxílio.

À ONCOVET-UFRGS, principalmente, Luciana Oliveira e Luciane Vieira pela enorme contribuição para realização deste trabalho.

À minha amiga Silvia Trapp pela ajuda de sempre e pela ideia que impulsionou essa dissertação.

À minha amiga Ananda Pires pelos momentos de aprendizados e treinamentos nos horários do almoço.

À professora Letícia Koester e seus orientados, da Faculdade de Farmácia da UFRGS, que possibilitaram o sonho dos placebos se tornar realidade.

Ao professor José Cláudio Moreira e seu orientado Henrique Gomes, da Faculdade de Bioquímica da UFRGS, pela imensa assistência na execução e interpretação dos testes de dano oxidativo.

Ao laboratório Vet Análises, especialmente, Helena Domingues e Natália Angeli pela oportunidade e assessoramento no desempenho do teste de troponina I.

Aos tutores que confiaram e cooperaram com meu trabalho, sobretudo, seus queridos cães que foram inspiração para elaboração dessa empreitada.

A todos da Faculdade de Veterinária da UFRGS que me auxiliaram nesse período.

Às empresas Animal Farma, Geyer Medicamentos e M Cassab pela doação de matérias primas para produção de comprimidos placebo.

E por fim, agradeço aos membros da banca pelo aceite.

RESUMO

A doxorrubicina tem um alto poder citotóxico e é usada para tratar um amplo espectro de malignidades humanas e de animais, entretanto, seu uso pode ser limitado devido a efeitos adversos causados por doses cumulativas. A cardiotoxicidade é um dos efeitos adversos mais conhecidos e irreversíveis, basicamente causado pelo estresse oxidativo e pela disfunção mitocondrial. A incidência da cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina diverge de acordo com a raça, enquanto que o desenvolvimento da cardiotoxicidade clínica varia de 4,0 a 18,3%. Em raças de cães com alto risco de desenvolvimento de cardiomiopatia dilatada a incidência é de 15,4% e em raças de baixo risco a incidência chega a 3,0%. Estudos foram realizados com o uso da doxorrubicina e os efeitos cardioprotetores do carvedilol e alguns mostraram que o carvedilol previne a disfunção sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo, além de danos estruturais e funcionais. No entanto, esses estudos foram feitos com diferentes espécies desde camundongos até humanos, mas não com cães com neoplasias. Portanto, este ensaio clínico foi delineado para avaliar o efeito cardioprotetor do carvedilol em cães. Um estudo prospectivo, randomizado, duplo-cego, controle placebo foi realizado em cães tratados com doxorrubicina. Foram incluídos 13 cães, os quais foram randomizados em dois grupos experimentais consistindo de seis cães no grupo carvedilol e sete cães no grupo placebo. No grupo carvedilol, a dose de 0,39mg/kg \pm 0,04 de carvedilol por via oral, duas vezes ao dia foi iniciado no mesmo dia da primeira quimioterapia com doxorrubicina e mantido durante todo o protocolo quimioterápico até a última avaliação cardiológica (15 dias após a última dose de doxorrubicina). Avaliações cardiológicas (ecocardiografia, eletrocardiograma e pressão arterial) foram realizadas antes da administração de doxorrubicina e a cada 10 a 15 dias após cada sessão de quimioterapia com doxorrubicina (T0, T1, T2, T3 e T4). Testes de troponina I e estresse oxidativo foram feitos com soro coletado dos cães na avaliação cardiológica inicial e final (T0 a T4). O estudo Doppler mostrou um aumento significativo ($p = 0,001$) do tempo de desaceleração do fluxo mitral (TDE) no grupo placebo e diferença significativa nas velocidades da onda E ($p = 0,0482$), tempo de desaceleração do fluxo mitral (TDE) ($p = 0,0029$) e relação E/TRIV ($p = 0,0155$) entre os grupos. Houve diferença significativa ($p = 0,0326$) na amplitude da onda R na derivação pré-cordial V4 entre os grupos e o intervalo QT teve um aumento significativo ($p = 0,0269$) desde o início até o final da quimioterapia no grupo placebo. Não houve diferença significativa nos parâmetros sistólicos, pressão arterial, mortalidade, troponina I e testes de estresse oxidativo. Em conclusão, o grupo carvedilol apresentou melhor desempenho na função diastólica e na despolarização e repolarização ventricular. Portanto, podemos sugerir que o carvedilol pode ter efeito benéfico em cães com câncer recebendo doxorrubicina. Contudo, mais estudos são necessários para demonstrar o efeito cardioprotetor do carvedilol contra a doxorrubicina em cães.

Palavras-chave: Cardiotoxicidade; Antraciclinas; Beta bloqueador; Canino; Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

Doxorubicin has a powerful cytotoxic effect and it is used to treat a wide spectrum of human and animal malignancies, but its use can be limited due to adverse effects caused by cumulative doses. Cardiotoxicity is one of the most known and irreversible adverse effects, which is basically caused by oxidative stress and mitochondrial dysfunction. The incidence of doxorubicin-induced cardiotoxicity differs according to breed in dogs, while development of clinical cardiotoxicity varies from 4.0 to 18.3%. In high-risk breeds for developing dilated cardiomyopathy the incidence is 15.4% and in low-risk breeds the incidence reaches 3.0%. Many different studies have been done with use of doxorubicin and cardioprotective effects of carvedilol and some had shown that carvedilol prevented the left ventricular systolic and diastolic dysfunction, beyond structural and functional damage. However, these studies were made with different species since mice until humans, but not with dogs as cancer patients. Therefore, we designed this clinical trial to evaluate the cardioprotective effect of carvedilol in dogs. A prospective, randomized, double-blind, placebo control study was done in dogs treated with doxorubicin. We enrolled 13 dogs and they were randomized in two experimental groups consisting of 6 dogs in carvedilol group and 7 dogs in placebo group. In the carvedilol group, 0.39mg/kg \pm 0.04 twice-daily oral carvedilol was started in the same day of first doxorubicin chemotherapy and maintained during all chemotherapy protocol until last cardiological evaluation (15 days after last dose of doxorubicin). Cardiological evaluations (echocardiography, electrocardiogram and blood pressure) were performed before doxorubicin administration and every 10 to 15 days after each session of chemotherapy with doxorubicin (T0, T1, T2, T3 e T4). Troponin I and oxidative stress tests were made with serum collected from dogs at the initial and last cardiological evaluation (T0 e T4). Doppler study showed a significant increase ($p = 0.001$) of mitral flow deceleration time (EDT) in the placebo group and significant difference at E velocities ($p = 0.0482$), mitral flow deceleration time (EDT) ($p = 0.0029$) and E/IVRT ratio ($p = 0.0155$) between groups. There was significant difference ($p = 0.0326$) in R voltage at V4 precordial chest lead between groups and QT interval had a significant increase ($p = 0.0269$) from baseline until end of chemotherapy in placebo group. There was no significant difference in systolic parameters, blood pressure, mortality, troponin I and oxidative stress tests. In conclusion, carvedilol group presented best performance in diastolic function and depolarization and repolarization ventricular. Therefore, we may suggest that carvedilol may have a beneficial effect in dog with cancer receiving doxorubicin. More studies are needed to demonstrate the cardioprotective effect of carvedilol against doxorubicin in dogs.

Keywords: *Cardiotoxicity; Anthracyclines; Beta block; Canine; Oxidative stress.*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOPP	Produtos proteicos de oxidação avançada
AST	Aspartato aminotransferase
CAR	Carvedilol
CEUA	Comitê de Ética em Uso de Animais
CK	Creatina quinase
CK-MB	Creatina quinase fração MB
cTnI	Troponina I
cTnT	Troponina T
DOX	Doxorrubicina
DoxQ	Derivado da doxorrubicina sintetizado pela conjugação de doxorrubicina e quercetina
DZR	Dexrazoxane
ET	Tempo de ejeção
FRAP	Poder antioxidante de redução férrico
GPx	Glutathione peroxidase
HCV	Hospital de Clínicas Veterinárias
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular-1
LDH	Desidrogenase láctica
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
PEP	Tempo de pré-ejeção
RNA _m	RNA mensageiro
ROS	Espécies reativas ao oxigênio
SOD	Superóxido dismutase
TAU	Constante do tempo diastólico do ventrículo esquerdo
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TRAP	Potencial antioxidante reativo total
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
U. S. FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos da América

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 CARDIOTOXICIDADE INDUZIDA PELO DOXORRUBICINA.....	11
2.2 PREVENÇÃO DOS EFEITOS CARDIOTÓXICOS INDUZIDOS PELA DOXORRUBICINA.....	15
2.3 CARVEDILOL E SUA ATUAÇÃO	18
2.4 TROPONINA I	21
2.5 ESTRESSE OXIDATIVO	24
3 OBJETIVOS	27
3.1 OBJETIVO GERAL	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
4 ARTIGO CIENTÍFICO.....	28
CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a maior longevidade dos animais de estimação está associada aos avanços da Medicina Veterinária, que engloba desde o caráter preventivo até ao diagnóstico precoce de algumas doenças. Entretanto, com a maior longevidade, ocorre também uma maior incidência de afecções relacionadas à idade avançada e dentre elas, as afecções oncológicas.

A doxorrubicina é um quimioterápico rotineiramente empregado para o tratamento antineoplásico de diversos neoplasmas em Medicina e em Medicina Veterinária, devido ao seu alto poder de induzir remissão tumoral. No entanto, o seu uso pode ser limitado devido aos efeitos adversos provocados com o emprego de doses cumulativas (TAN et al., 1973; SIMUNEK et al., 2009). Um dos efeitos adversos mais conhecido e irreversível é a cardiotoxicidade, a qual é causada por estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (DOROSHOW, 1983). A incidência da cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina diverge de acordo com a raça, enquanto que o desenvolvimento da cardiotoxicidade clínica varia de 4 a 18,3% (MAULDIN et al., 1992; HALLMAN et al., 2019). Em raças de cães com alto risco de desenvolvimento de cardiomiopatia dilatada a incidência é de 15,4% e em raças de baixo risco a incidência chega a 3,0% (HALLMAN et al., 2019).

Estudos em outras espécies mostraram o efeito benéfico do carvedilol em cardiomiopatia induzida pela doxorrubicina. Santos e colaboradores (2002) analisaram corações de ratos que foram submetidos ao tratamento com doxorrubicina e carvedilol durante sete semanas e concluíram que o carvedilol protegeu o tecido cardíaco de danos estruturais e funcionais. Também foi demonstrado que o tratamento concomitante com carvedilol e doxorrubicina em coelhos reduziu a disfunção sistólica do ventrículo esquerdo, o número de fibras apoptóticas e a ocorrência de fibrose intersticial nos ventrículos direito e esquerdo em alguns animais (ROSA, 2016).

Um estudo randomizado com 25 pacientes oncológicos humanos, em quimioterapia com doxorrubicina ou epirrubicina, visou estudar o efeito profilático do carvedilol frente à cardiomiotoxicidade comparando com grupo placebo. Os pacientes receberam carvedilol durante seis meses e as avaliações ecocardiográficas foram feitas antes e após as quimioterapias. Houve diminuição significativa da fração de ejeção e aumento significativo nos diâmetros sistólicos e diastólicos no grupo controle, quando comparado

com o grupo que recebeu o carvedilol, sugerindo eficácia do fármaco na manutenção da função sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo (KALAY et al., 2006).

Apenas um estudo foi encontrado com a utilização do carvedilol em cães com intuito de avaliar seu efeito cardioprotetor frente à cardiotoxicidade causada pela doxorrubicina. Todavia, neste estudo foram empregados cães saudáveis que receberam doxorrubicina intracoronariana e dose de carvedilol de 2,5mg/kg por dia, por via oral. Ainda assim, pode-se concluir que o carvedilol apresentou melhora em alguns parâmetros de função sistólica, função diastólica e eletrocardiográficos (SAWANGKOON, 2002).

Objetivou-se com esta dissertação avaliar o efeito cardioprotetor do carvedilol em cães submetidos à quimioterapia com doxorrubicina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cardiotoxicidade induzida pelo doxorrubicina

A doxorrubicina ou adriamicina é um antibiótico derivado do pigmento vermelho produzido pelo fungo *Streptomyces peucetius*, pertencente à classe das antraciclinas (ARCAMONE et al., 1969). No final dos anos 60, a doxorrubicina começou a ser utilizada como agente antineoplásico, sucedendo os primeiros ensaios clínicos no Instituto Nacional do Câncer em Milão, Itália (TAN et al., 1973).

As antraciclinas atuam independente da fase do ciclo celular, possuem anel de antraciclina em sua estrutura e intercalam-se entre os pares de base do DNA de fita dupla. A maioria das antraciclinas liga-se às proteínas plasmáticas e entram nas células por difusão passiva. Sua molécula é distribuída rapidamente pelo tecidos, porém é eliminada vagarosamente do plasma, com meia-vida de 18 a 32 horas, e não ultrapassa a barreira hematoencefálica. Sua depuração ocorre por biotransformação hepática e excreção biliar, com pouquíssima excreção renal (DAGLI; LUCAS, 2006; DALECK; DE NARDI, 2016).

Apesar de os mecanismos de ação desse fármaco não estarem completamente elucidados, sua atividade antineoplásica pode ocorrer pela inibição da DNA topoisomerase II, bloqueio da DNA polimerase e pelo anexo do fármaco entre os pares de base do DNA, conseqüentemente, impedindo síntese de macromoléculas, induzindo apoptose e produzindo radicais livres durante sua biotransformação capazes de lesar membranas celulares e o DNA (SUSANECK, 1983; DAGLI; LUCAS, 2006; FERREIRA; MATSUBARA; MATSUBARA, 2008).

A cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina é o efeito tóxico mais conhecido. Ela difere dos outros fármacos do grupo pela presença de um grupo hidroxila no carbono 14, caracterizando sua especificidade em cardiotoxicidade. Como a musculatura cardíaca tem baixa concentração das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutationala peroxidase, não consegue eliminar os radicais livres produzidos e, por isso, ocorre necrose celular que leva a uma limitação na dose máxima a ser administrada durante a quimioterapia (DAGLI; LUCAS, 2006; DALECK; DE NARDI, 2016).

A doxorrubicina deve ser administrada exclusivamente via intravenosa, visto que quando extravasada causa necrose tecidual grave. Sua administração deve ser lenta durante

pelo menos 10 a 30 minutos. A dose para cães varia de acordo com o peso, até 10 kg é 1 mg/kg e acima de 10 kg é 30 mg/m², a cada três semanas, não podendo exceder a dose cumulativa de 240 mg/m² (DALECK; DE NARDI, 2016). Além da cardiotoxicidade, leucopenia, trombocitopenia, náuseas, vômitos e reações anafiláticas são outros sinais de toxicidade. Sua indicação geralmente é para linfomas, carcinomas e sarcomas, como parte do protocolo, ou como único agente (DAGLI; LUCAS, 2006).

Doroshov (1983) descreveu o efeito dos agentes antineoplásicos antraciclina no coração de ratos, sugerindo que a formação de radicais livres por esses compostos excede a capacidade de detoxificação da mitocôndria e do retículo sarcoplasmático. Foi demonstrado um aumento na concentração de ânion peróxido e na produção de peróxido de hidrogênio, ocorrendo apesar da presença da glutatona peroxidase e superóxido dismutase, as quais são duas das principais enzimas cardíacas contra radicais livres.

A toxicidade aguda foi documentada em ratos em estudo empregando a doxorrubicina. Após 48 horas da administração do fármaco, os ratos apresentaram déficit diastólico e sistólico no ecocardiograma, e após eutanásia, foi observado aumento da rigidez passiva miocárdica (*in vitro*) e ativação de metaloproteínase 2 no miocárdio, a qual é uma enzima proteolítica ativada por inflamação ou estresse oxidativo (POLEGATO et al., 2015).

Um estudo apontou que alterações cardíacas clínicas ocorreram em 32 dos 175 cães (18,3%) analisados com diversos tipos de câncer e que foram tratados com doxorrubicina. Destes 32 cães, 31 apresentaram alterações eletrocardiográficas (sendo mais comum complexos ventriculares prematuros, arritmias supraventriculares e variação na amplitude da onda R) e sete tiveram insuficiência cardíaca congestiva (média de dose cumulativa 150 mg/m², variando de 90 a 210 mg/m²) com desfecho fatal dentro de 90 dias. A média de dose cumulativa nos cães que apresentaram alterações eletrocardiográficas foi de 90 mg/m² (variando de 30 a 200 mg/m²), com média de 77 dias do início do tratamento (de 1 a 287 dias). A ecocardiografia só foi utilizada em cinco cães após o desenvolvimento de insuficiência cardíaca congestiva, os quais expressaram dilatação do ventrículo esquerdo com aumento da distância E-septo, aumento dos diâmetros diastólicos e sistólicos finais e frações de encurtamento que variaram de 9 a 19%. Estes cinco cães tinham média de 150 mg/m² de dose cumulativa (150 a 180 mg/m²) (MAULDIN et al., 1992).

Na tentativa de amenizar a toxicidade cardíaca causada pela doxorrubicina, um estudo retrospectivo avaliou alterações eletrocardiográficas e ecocardiográficas em cães

que receberam sua aplicação intravenosa durante uma hora. Foram incluídos 133 cães com média de dose cumulativa de 120 mg/m² e 12% (16 cães) desenvolveram alterações eletrocardiográficas durante ou após o tratamento, sendo menor que a incidência histórica de 17,7% (GILLINGS et al., 2009).

Outro estudo retrospectivo teve como objetivo estabelecer a incidência e os fatores de riscos associados no desenvolvimento da cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina em cães. Foram incluídos 494 cães que receberam pelo menos uma dose de doxorrubicina durante os anos de 2006 a 2015. A alta dose cumulativa de doxorrubicina, maior peso corporal, diminuição da fração de encurtamento após cinco doses (dose cumulativa de 150 mg/m²) e o desenvolvimento de complexos ventriculares prematuros foram significativamente associados com sinais clínicos de cardiotoxicidade. Dos 494 cães apenas 4% (20 cães) evoluiu para manifestação clínica de cardiotoxicidade (síncope, letargia, fraqueza, intolerância ao exercício, dificuldade respiratória causada pela insuficiência cardíaca congestiva e morte súbita) e com isso, pode-se correlacionar que raças com alto risco de desenvolvimento de cardiomiopatia dilatada tiveram incidência de 15,4% enquanto raças com baixo risco demonstraram incidência de 3%. Neste trabalho, a duração da infusão de doxorrubicina não foi significativamente associada com a cardiotoxicidade clínica (HALLMAN et al., 2019).

Alguns estudos e relatos sobre as consequências da doxorrubicina em cães foram publicados (SILVA et al., 2004; SILVA; CAMACHO, 2005; PEREIRA NETO et al., 2006; SOUSA et al., 2014).

Silva e colaboradores (2004) analisaram os efeitos cardíacos, hemáticos e bioquímicos em cães saudáveis que foram submetidos à administração de doxorrubicina 30 mg/m² a cada 21 dias durante 168 dias (dose cumulativa total 240 mg/m², ou seja, oito aplicações), comparando com cães saudáveis que receberam solução salina 0,9% da mesma forma. Essencialmente, foram observados sinais clínicos e radiográficos compatíveis com insuficiência cardíaca congestiva em cinco cães (71%) do grupo doxorrubicina, dos quais três faleceram e foi evidenciado no exame anatomopatológico discreta dilatação cardíaca, edema e congestão pulmonar. Os sinais clínicos foram observados em média 165 dias após o início do protocolo com doxorrubicina, com variação de 147 a 175 dias. Ademais, cães deste grupo apresentaram neutropenia e leucopenia transitórias e elevação nas atividades séricas de desidrogenase láctica (LDH),

aspartato aminotransferase (AST) e creatina quinase (CK), sendo esta última a única que aumentou acima da referência para cães.

Seguindo o mesmo delineamento do estudo anterior, Silva e coautores (2005) focaram nas alterações ecocardiográficas dos mesmos cães. Corroborou-se aumento significativo no diâmetro e volume do ventrículo esquerdo, primeiramente na sístole (20ª semana) e posteriormente na diástole (25ª semana), aumento da distância E-septo (21ª semana), diminuição de cerca de 65% nas frações de encurtamento e ejeção (18ª semana), além de hipocinesia de parede livre do ventrículo esquerdo e septo interventricular. O diâmetro do átrio esquerdo e relação átrio esquerdo/aorta aumentaram significativamente na avaliação da dose cumulativa de 240 mg/m², ou seja, 25ª semana.

Outro estudo do mesmo grupo de pesquisa monitorou cães com cardiomiopatia dilatada induzida por doxorubicina por eletrocardiografia Holter. Neste estudo, cinco cães saudáveis que receberam 30 mg/m² de doxorubicina a cada 21 dias até alcançar a dose cumulativa (180 ou 240 mg/m²), foram comparados com cinco cães saudáveis que receberam solução salina. Antes de cada aplicação, os cães foram examinados ecocardiograficamente para averiguar disfunção miocárdica (fração de encurtamento < 20%, distância E-septo > 0,7cm e aumento do volume final sistólico do ventrículo esquerdo) e a partir do momento que era identificada, havia suspensão da administração de doxorubicina e era feito o exame Holter 24 horas. Em comparação ao grupo controle, os cães do grupo doxorubicina apresentaram aumento significativo na frequências cardíacas mínimas e médias e maior frequência de arritmias supraventriculares do que ventriculares (PEREIRA NETO et al., 2006).

E por fim, mais uma pesquisa desse grupo comparou o índice TEI com parâmetros padrões ecocardiográficos de função sistólica e diastólica em sete cães saudáveis que receberam doxorubicina, da mesma forma que os estudos anteriormente citados, totalizando 210 mg/m² (sete aplicações). O índice TEI avalia a função ventricular global baseado na seguinte fórmula (tempo de contração isovolumétrica + tempo de relaxamento isovolumétrico)/tempo de ejeção ventricular esquerda, ou seja, abrangendo parâmetro sistólico e diastólico (TEI, 1995). As avaliações ecocardiográficas foram realizadas no início da pesquisa seguindo a cada 21 dias até a dose total cumulativa (210 mg/m²) durante 147 dias. O índice TEI, tempo de relaxamento isovolumétrico, período de pré-ejeção e relação de período de pré-ejeção pelo tempo de ejeção do ventrículo esquerdo foram capazes de constatar efeitos cardiotóxicos da doxorubicina na função miocárdica com

dose cumulativa de apenas 60 mg/m². E alguns parâmetros padrões de função sistólica e diastólica (diâmetro do ventrículo esquerdo na sístole, fração de ejeção e fração de encurtamento) apresentaram alterações com 120 mg/m², sugerindo assim que o índice TEI pode servir como um parâmetro mais precoce de avaliação da cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina (SOUSA et al., 2014).

2.2 Prevenção dos efeitos cardiotóxicos induzidos pela doxorubicina

A doxorubicina lipossomal foi estudada na tentativa de reduzir os efeitos colaterais da sua formulação livre (HERMAN et al., 1983; KANTER et al., 1993; WORKING et al., 1999). Com o encapsulamento da doxorubicina em lipossomos, há o retardo efetivo de sua absorção no tecido cardíaco, quando comparado com o fármaco livre (RAHMAN et al., 1980).

Herman e colaboradores (1983) demonstraram as diferenças entre os efeitos de doxorubicina livre e encapsulada em lipossomos em cães Beagles. O estudo foi finalizado após uma semana da décima sétima sessão (dose total 12,25 mg/kg ou 367,5 mg/m²), que ocorriam com intervalo de três semanas. Inapetência, perda de peso, morte natural e eutanásia por condições desfavoráveis ocorreram no grupo de doxorubicina livre. Além disso, vacuolização e perda de miofibrilas foram observadas somente no grupo no qual foi administrado a doxorubicina livre.

Outro estudo com Beagles, com oito ciclos em intervalo de três semanas (dose total 12 mg/kg ou 360 mg/m²), também documentou a redução da cardiotoxicidade da doxorubicina lipossomal quando comparada com a doxorubicina livre, entretanto, correlacionou semelhança na mielossupressão (KANTER et al., 1993). Similarmente, Working e colaboradores (1999) compararam doxorubicina lipossomal e livre em Beagles e camundongos, durante 10 sessões com intervalo de três semanas (dose total 10 mg/kg ou 300 mg/m²). Nos cães, não houve evidência histológica de cardiotoxicidade com doxorubicina lipossomal, porém houve vacuolização e perda de miofibrilas com doxorubicina livre. Nos camundongos, houve evidência de cardiomiopatia progressiva em ambos os grupos, entretanto mais agressivas e frequentes no grupo de doxorubicina livre, apresentando até mortes por insuficiência cardíaca congestiva. Todavia, apesar de resultados satisfatórios, o custo benefício do tratamento ainda não é viável na rotina clínica veterinária (VEJPONGSA; YEH, 2014).

A doxorubicina contida em microemulsão é outra opção de atenuação da cardiotoxicidade, por meio do direcionamento do quimioterápico para o tecido tumoral (DALECK; DE NARDI, 2016). Uma pesquisa em ratos mostrou que a doxorubicina em microemulsão aumentou significativamente sua concentração plasmática e apresentou menor volume de distribuição quando comparada com a doxorubicina convencional, ou seja, seu menor volume de distribuição modifica o acesso da droga em locais suscetíveis, associado a manutenção do valor sérico de creatina quinase MB após seu uso também em relação ao doxorubicina convencional (ASSUMPCÃO et al., 2013).

O mesmo grupo avaliou a disseminação da doxorubicina em microemulsão diretamente no tecido tumoral e no tecido cardíaco de ratos. Por meio da cromatografia, não foi observado diferença na distribuição dos dois tipos de doxorubicina no tumor, entretanto, uma quantidade significante menor de doxorubicina em microemulsão foi verificada tecido cardíaco (CANDIDO et al., 2014).

Recentemente foi analisado *in vitro* um novo derivado da doxorubicina denominado DoxQ, sintetizado pela conjugação de doxorubicina e quercetina, esta que é um flavanoide derivado de plantas com efeitos inibitórios sobre a glicoproteína P e com propriedades antioxidantes. Concisamente, DoxQ foi menos citotóxica para cardiomiócitos humanos e de ratos e com menos danos oxidativos, quando comparada com a doxorubicina (ALRUSHAID et al., 2017).

Alguns estudos foram realizados na tentativa de pesquisar agentes que poderiam prevenir ou minimizar os efeitos deletérios das antraciclinas (VAN VLEET et al., 1978; FITZPATRICK; DERVISIS; KITCHELL, 2010; ARICA et al., 2013; VEJPONGSA; YEH, 2014; GOYAL et al., 2016).

Van Vleet e colaboradores (1978) relataram que a administração de vitamina E diminuiu a incidência e gravidade da cardiomiopatia induzida pela doxorubicina em coelhos, além do decréscimo da mortalidade durante dez semanas de estudo. Insinuou-se que a proteção conferida pela vitamina E no coração está associada à estabilização da membrana dos miócitos ou à prevenção da inibição da coenzima Q10 mitocondrial.

A dexrazoxane é um quelante de ferro reconhecido pela U.S. FDA (Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos da América) como agente cardioprotetor para a cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina. Esta característica é específica da dexrazoxane através da mudança da configuração da topoisomerase II, pois

outros quelantes de ferro não induzem este efeito cardioprotetor (VEJPONGSA; YEH, 2014).

Imondi e colaboradores (1996) avaliaram este efeito em camundongos, ratos e cães. Em camundongos, houve diminuição no escore de severidade de alterações histopatológicas, porém foi menos eficaz em dose mais alta de doxorubicina. Em ratos, houve redução do escore até em alta dose de doxorubicina, mas ainda havia uma quantidade significativa de injúria cardíaca quando comparado com controle. E em cães, houve a redução significativa no escore, entretanto, lesões cardíacas ainda estavam presentes no grupo que recebeu dexrazoxane. Com isso, concluiu-se que a dexrazoxane apresentou uma adequada proteção com baixas doses de doxorubicina e uma proteção menos efetiva com altas doses, podendo se justificar pela diferença na farmacocinética dos fármacos, com eliminação mais rápida da dexrazoxane do organismo em relação à doxorubicina.

Uma pesquisa, com cães como pacientes oncológicos em tratamento com doxorubicina (DOX), analisou o efeito da dexrazoxane (DZR) com média de duas aplicações por animal (proporção DZR:DOX de 10:1). Não houve alterações significativas nas avaliações ecocardiográficas e nem declínio na função sistólica após a administração concomitante de doxorubicina e dexrazoxane, sugerindo segurança e boa tolerância no uso associado de ambas (FITZPATRICK; DERVISIS; KITCHELL, 2010).

Um estudo retrospectivo sobre a incidência da cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina em cães apresentou pouquíssimos cães que receberam DZR. Porém, ainda assim os autores sugeriram que seu uso deve ser associado a DOX, principalmente em raças de alto risco de desenvolvimento de cardiomiopatia dilatada e especialmente se um bom prognóstico é esperado (HALLMAN et al., 2019) Assim como a doxorubicina lipossomal, a dexrazoxane tem um alto custo (VEJPONGSA; YEH, 2014).

O enalapril, fármaco de inibidor da enzima conversora de angiotensina, foi estudado como possível cardioprotetor. Foram avaliados 473 pacientes oncológicos e 114 deles (que apresentaram aumento no níveis de troponina I) foram randomizados em grupo enalapril e grupo placebo. O tratamento começou um mês após o término do protocolo de alta dose de doxorubicina e seguiu por um ano, havendo avaliações cardiológicas durante esse período. Um decréscimo significativo na fração de ejeção e aumento nos volumes diastólicos e sistólicos finais foram observados apenas no grupo placebo, sugerindo que o

tratamento com enalapril pode prevenir o desenvolvimento tardio da cardiotoxicidade (CARDINALE et al., 2006).

A N-acetilcisteína foi outro composto recentemente estudado em ratos com modelo de disfunção cardíaca induzida por doxorubicina (ARICA et al., 2013; GOYAL et al., 2016). Os autores concluíram que a N-acetilcisteína teve efeito cardioprotetor preventivo demonstrado em marcadores de estresse oxidativo e no exame histológico por diminuir o estresse oxidativo e apoptose (ARICA et al., 2013; GOYAL et al., 2016).

2.3 Carvedilol e sua atuação

O carvedilol foi outro fármaco estudado devido ao seu efeito cardioprotetor. Pertence à terceira geração dos bloqueadores beta-adrenérgicos não seletivos com propriedades vasodilatadoras, isto é, atividade em receptores α_1 e β_1 (DAGLI; LUCAS, 2006; GORDON et al., 2006). Seus metabólitos são primariamente excretados na bile e a maioria excretada em 24 horas (SCHAEFER et al., 1998). A dose de 0,3mg/kg, por via oral, a cada 12 horas tem sido utilizado em ensaios clínicos com cães recebendo carvedilol (MARCONDES-SANTOS et al., 2007; OYAMA et al., 2007; SOARES et al., 2010).

Vários estudos provaram o efeito antioxidante e cardioprotetor do carvedilol (ASANUMA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2004; SPALLAROSSA et al., 2004; ROSA, 2016). Estudo *in vitro* com cultura de células miocárdicas evidenciou que o carvedilol altera a expressão do RNA mensageiro (RNAm) dos genes Bax- α (pro-apoptose) e Bcl-2 (anti-apoptose), antagonizando o efeito da doxorubicina. Seu uso no pré-tratamento celular preveniu o aumento da expressão de Bax- α e diminuição de Bcl-2, efeitos induzidos pela doxorubicina. Através da determinação da atividade da caspase-3, protease correlacionada com apoptose, foi demonstrado que ocorre seu aumento com a presença de doxorubicina na cultura celular, ao contrário do carvedilol que inibe sua ativação com dose dependente (SPALLAROSSA et al., 2004).

O efeito antioxidante do carvedilol pode inibir ações citotóxicas diretas de radicais livres e prevenir que radicais livres ativem fatores de transcrição e genes associados à inflamação e remodelamento cardíaco na hipertensão sistêmica, doença coronariana e insuficiência cardíaca congestiva. Ele inibe a expressão do gene que codifica a molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1) e a molécula de adesão para leucócitos polimorfonucleares, que caracteristicamente infiltram o miocárdio em condições de

isquemia, com isso exacerbando a injúria isquêmica. Igualmente, sua ação antioxidante é demonstrada pela inibição da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), ou seja, prevenindo a formação da forma citotóxica e aterogênica (RUFFOLO; FEUERSTEIN, 1997).

O carvedilol também é responsável por efeito cardioprotetor contra isquemia e lesão por reperfusão via mecanismos dependentes de adenosina, a qual é relacionada com melhora na insuficiência cardíaca crônica ou isquemia miocárdica. Tal efeito foi demonstrado no estudo de Asanuma e colaboradores (2004) que realizou a oclusão da artéria coronária anterior descendente esquerda, de cães anestesiados, por 90 minutos, seguido de reperfusão de seis horas. Houve comparação com o propranolol, porém concluiu-se que apenas o carvedilol aumentou liberação de adenosina e fluxo sanguíneo coronariano em corações isquêmicos e não isquêmicos por redução do estresse oxidativo.

Além de outros estudos compararem o carvedilol e atenolol na tentativa de associar o efeito cardioprotetor à ação beta bloqueadora, foi comprovado que a diferença está na propriedade do carvedilol em reduzir a liberação de radicais livres e não no seu efeito beta bloqueador (MATSUI et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2004; SPALLAROSSA et al., 2004).

Pesquisas envolvendo o carvedilol em doenças cardíacas degenerativas em cães também foram feitas (MARCONDES-SANTOS et al., 2007; OYAMA et al., 2007; SOARES et al., 2010). Em doença valvar mitral foi comparado grupo com tratamento convencional e grupo com tratamento convencional acrescido de carvedilol com a hipótese que o beta bloqueador poderia modular a ação do sistema nervoso simpático. Entretanto, os autores apenas sugeriram um efeito benéfico na qualidade de vida, na classificação funcional e redução da pressão sistólica (MARCONDES-SANTOS et al., 2007).

Na cardiomiopatia dilatada em cães não foi possível comprovar a melhora em variáveis ecocardiográficas e neurohormonais com uso de carvedilol comparado a placebo, sugerindo como limitações o grau de severidade da doença, a dose do carvedilol e até mesmo o curto período de acompanhamento do estudo, no caso quatro meses (OYAMA et al., 2007). Entretanto, Soares e colaboradores (2010) compararam grupos com tratamento tradicional e tratamento convencional acrescido de carvedilol e concluíram que não houve diferença na sobrevida e na maioria das variáveis ecocardiográficas, porém o diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo indexado à superfície corpórea teve aumento significativo no grupo sem carvedilol, sugerindo efeito benéfico no remodelamento ventricular.

Sawangkoon (2000) e colaboradores avaliaram os efeitos cardiovasculares agudos do carvedilol em cães saudáveis e sua farmacocinética. Os cães receberam dosagens sequenciais do medicamento concomitantemente com aferições da concentração plasmática do mesmo. A dosagem de aproximadamente 150 mcg/kg resultou em concentração plasmática de 100 ng/mL, sendo esta a concentração terapêutica em humanos, a qual resultou na diminuição da pós-carga e efeito inotrópico positivo, sugerindo benefício no tratamento de insuficiência cardíaca e na minimização dos efeitos cardiotoxícos.

A miocardite auto-imune experimental foi induzida por sonda gástrica em ratos, os quais foram incluídos em três grupos que receberam doses diferentes de carvedilol (2, 10 e 30 mg/kg por dia) e um grupo controle, para avaliar a ação cardioprotetora do carvedilol. Após três semanas, o grupo com dose menor apresentou prevenção significativa no aumento do diâmetro diastólico de ventrículo esquerdo e na diminuição da fração de encurtamento, enquanto que a dose de 10 mg/kg e de 30 mg/kg diminuíram significativamente no diâmetro diastólico de ventrículo esquerdo e na fração de encurtamento, respectivamente. Em suma, os efeitos protetores do carvedilol parecem estar relacionados com sua capacidade de diminuir a atividade da metaloproteinase-2, prevenindo a degradação de miofilamentos e liberação de troponina I, apesar disso não estar relacionado com a supressão da inflamação (SKRZYPIEC-SPRING et al., 2017).

Recentemente, foram publicados estudos correlacionando a doxorrubicina e o carvedilol *in vitro*, ratos e humanos (ABUOSA et al., 2018; KHEIRI et al., 2018; PARK; STEINBERG, 2018; ZHANG; YANG; ZHANG, 2019). Abuosa e colaboradores (2018), por meio de um estudo prospectivo, randomizado, duplo cego e controle placebo, estudaram a prevenção da disfunção ventricular, pelo uso profilático do carvedilol, em pacientes oncológicos em tratamento com doxorrubicina. O total de 154 pacientes foram randomizados em quatro grupos (placebo; carvedilol 6,25 mg por dia; carvedilol 12,5 mg por dia e carvedilol 25 mg por dia) e após seis meses, apesar de ter havido redução significativa na fração de ejeção do ventrículo esquerdo no grupo placebo, não houve diferença estatística entre os grupos carvedilol. Além disso, não houve diferença estatística entre grupos carvedilol e placebo em relação à disfunção diastólica, insuficiência cardíaca clínica ou morte.

Os efeitos protetores de carvedilol e ácido carnósico foram estudados *in vitro* e *in vivo* (modelo de injúria miocárdica em ratos) em relação à cardiotoxicidade induzida pela

doxorubicina. Quando usados separados apresentaram efeito moderado na atenuação da cardiotoxicidade e quando em conjunto, mostraram redução significativa no acúmulo de colágeno e melhora na disfunção cardíaca. Ademais, a combinação reduziu significativamente a resposta inflamatória, estresse oxidativo excessivo, apoptose e autofagia (ZHANG; YANG; ZHANG, 2019).

E para concluir, uma meta-análise sobre o uso de carvedilol na profilaxia da cardiotoxicidade induzida pelas antraciclinas reuniu oito ensaios clínicos humanos controlados randomizados, totalizando 633 pacientes. Os resultados evidenciaram menor redução na fração de ejeção do ventrículo esquerdo em pacientes tratados com carvedilol em comparação com placebo (KHEIRI et al., 2018).

Um estudo buscou avaliar o uso do carvedilol em cães com intuito de avaliar seu efeito cardioprotetor frente à cardiotoxicidade causada pela doxorubicina. Quatorze cães saudáveis receberam 0,75 mg/kg de doxorubicina intracoronariana semanalmente, durante quatro semanas. Estes cães foram divididos em dois grupos, um grupo recebeu apenas a doxorubicina (grupo 1) e o outro grupo (grupo 2) recebeu a doxorubicina e carvedilol (2,5 mg/kg diário) por via oral um pouco antes no dia da primeira dose de DOX, totalizando nove semanas, ainda assim cada grupo tinha um cão que recebeu DOX por cinco semanas. Pode-se concluir que o carvedilol apresentou efeito cardioprotetor pois manteve a pressão arterial sistêmica e a variabilidade da frequência cardíaca, além da relação PEP/ET (tempo de pré-ejeção/tempo de ejeção), a qual avalia função sistólica. Somado a isso, minimizou o prolongamento do intervalo QT e o índice TAU (constante do tempo diastólico do ventrículo esquerdo), o qual era utilizado para avaliação da função diastólica (SAWANGKOON, 2002).

2.4 Troponina I

Os marcadores cardíacos são novas ferramentas de avaliação cardiológica, contribuindo tanto para diagnóstico de lesão/alteração cardíaca, quanto para prognóstico. Podem ser utilizados em cães para detecção de injúria cardíaca e da severidade da insuficiência cardíaca (SPRATT et al., 2005).

As troponinas cardíacas são proteínas miofibrilares que fazem parte do complexo troponina-tropomiosina nos filamentos de actina, esta que atua com a miosina para contração e relaxamento dos cardiomiócitos. As troponinas são divididas em troponina C, na qual o cálcio se liga; troponina I, que inibe a tropomiosina e troponina T, responsável

pela ligação da troponina. A musculatura cardíaca e esquelética possuem troponinas, no entanto, isoformas específicas estão presentes no coração de troponina I e troponina T, ou seja, formas antigenicamente distintas da musculatura esquelética (ADAMS III et al., 1993; SASSE et al., 1993).

Como as troponinas cardíacas são intracelulares, sua mensuração na corrente sanguínea indica que houve liberação de conteúdo intracelular, isto é, lesão de cardiomiócitos (BARISON; PASTORMERLO; GIANNONI, 2011). Após um insulto cardíaco, a troponina I (cTnI) é desvincilhada várias vezes e em maiores concentrações, que a troponina T (cTnT) (O'BRIEN, 2008). Sugere-se que este padrão possa ser determinado pelo peso molecular menor da cTnI ou até pelo maior envolvimento da cTnT com o aparato contrátil (SCHOBER; KIRBACH; OECHTERING, 1999).

A troponina I aumenta sua concentração na circulação em cinco a sete horas após a injúria cardíaca e persiste por até oito dias (CUMMINS; AUCKLAND; CUMMINS, 1987; ADAMS III et al., 1993). Contudo, há a possibilidade de renovação de cardiomiócitos como um processo natural do organismo e liberação de troponina na circulação (BERGMANN et al., 2009). Por isso, cães e gatos saudáveis podem apresentar uma baixa concentração de cTnI mensurável no sangue, < 0,03 a 0,07 ng/mL em cães e < 0,03 a 0,16 ng/mL em gatos (SLEEPER; CLIFFORD; LASTER, 2001).

Inicialmente, a troponina I foi utilizada em humanos para auxílio diagnóstico em infarto agudo do miocárdico (CUMMINS; AUCKLAND; CUMMINS, 1987). Por ser um biomarcador sanguíneo sensível e específico, além de persistente indicador de injúria miocárdica, sua utilização na medicina veterinária se deu através de ensaios humanos, os quais mostraram fidedignidade (O'BRIEN; LANDT; LADENSON, 1997; O'BRIEN et al., 2006).

A troponina I foi demonstrada mais sensível para injúria miocárdica em comparação à troponina T e creatinafosfoquinase-isoenzima MB, esta que também pode aumentar devido à injúria de musculatura esquelética e doença renal (ADAMS III et al., 1993; SCHOBER; KIRBACH; OECHTERING, 1999).

O aumento de troponina I pode ser verificada em outras afecções que podem desenvolver lesão em cardiomiócitos secundariamente. A síndrome dilatação-torção gástrica em cães é um exemplo que pode levar à injúria de cardiomiócitos com comprovação histopatológica, por meio de isquemia, hipoperfusão, reperfusão, liberação de mediadores inflamatórios, distúrbios ácido-base e eletrolíticos, entre outros. Também se

correlacionou a maior concentração com de cTnI com maior gravidade nas alterações eletrocardiográficas e no desfecho pior no quadro do paciente (HORNE et al., 1985; SCHOBER et al., 2002).

Outrossim, o trauma torácico igualmente pode causar lesão em células miocárdicas cardíacas refletindo no aumento de cTnI (SCHOBER; KIRBACH; OECHTERING, 1999), assim como erliquiose (DINIZ et al., 2008), babesiose (LOBETTI; DVIR; PEARSON, 2002) sepse e choque em humanos (AMMANN et al., 2001), acidente ofídico (SEGEV et al., 2008; LANGHORN et al., 2014), parvovirose (KOCATURK et al., 2012), inflamação sistêmica (LANGHORN et al., 2013), dentre outros.

Estudos com doenças cardíacas em cães também foram conduzidos para avaliar cTnI. Um em específico mediu a concentração de troponina I em cães com doença valvar crônica, cardiomiopatia dilatada e estenose subaórtica em comparação com cães saudáveis. Houve aumento significativo na cTnI em cães cardiopatas em relação aos saudáveis e além disso, os valores de cTnI se correlacionaram com aumento de átrio e ventrículo esquerdo na doença valvar crônica e cardiomiopatia dilatada e com a espessura da parede do ventrículo esquerdo na estenose subaórtica (OYAMA; SISSON, 2004).

Fonfara e colaboradores (2010) semelhantemente demonstraram a troponina I como marcador de severidade e prognóstico em cães com diversas doenças cardíacas. O grupo com valor de cTnI $\leq 0,15$ ng/mL, o qual continha os cães mais jovens e com doenças cardíacas iniciais ou estáveis ou até sem anormalidades cardíacas (sopro inocente ou sopro associado à anemia), apresentou maior sobrevida quando comparado aos outros dois grupos com cTnI 0,151 a 1,0 ng/mL e cTnI $> 1,01$ ng/mL com doenças cardíacas mais avançadas.

Da mesma forma, uma pesquisa sobre a troponina I em cães Dobermann Pinschers com cardiomiopatia, a qual foi conduzida com seis grupos com diferentes estágios da doença: a) grupo controle; b) grupo incipiente; c) grupo com alteração somente no eletrocardiograma; d) grupo com alteração somente na ecocardiografia; e) grupo com alteração no eletrocardiograma e ecocardiografia e f) grupo com doença clínica. Apesar da subdivisão de alterações da mesma doença, a concentração de cTnI foi maior em todos os grupos em relação ao grupo controle. Salientando que o grupo incipiente eram cães com ecocardiografia e Holter normais, porém que desenvolveram cardiomiopatia dilatada no período de um ano e meio, evidenciando também o fator preditivo da mensuração da cTnI (WESS et al., 2010).

Em relação ao diagnóstico prévio de lesão em cardiomiócitos pela doxorrubicina, em um estudo prospectivo com cães com diversos tipos de neoplasias malignas, a troponina I apresentou elevação precoce significativa na terceira semana de avaliação em relação ao valor basal, quando comparada com outros exames para avaliação cardiológica, como a ecocardiografia que mostrou diminuição significativa na fração de encurtamento e ejeção somente na nona semana (SURACHETPONG; TEEWASUTRAKUL; RUNGSIPIPAT, 2016). Neuwald (2009) constatou que cães em tratamento com doxorrubicina podem apresentar arritmias cardíacas sem aumento nas troponinas cardíacas, entretanto, quando se correlacionou especificamente com complexos atriais prematuros e ventriculares, houve elevação na concentração de cTnI.

Um estudo retrospectivo, em cães com linfoma e osteossarcoma que receberam doxorrubicina, observou que a elevação de cTnI não necessariamente se correlacionou com sinais clínicos de cardiomiopatia. Porém, cães que posteriormente desenvolveram cardiomiopatia, apresentaram elevações nas concentrações de cTnI antes dos sinais clínicos se tornarem evidentes. Ou seja, não foi possível relacionar que o aumento de cTnI durante a quimioterapia irá prever que o paciente desenvolverá cardiomiopatia induzida por doxorrubicina (SELTING et al., 2004).

Outro estudo piloto com 13 cães em tratamento com doxorrubicina para diversos neoplasmas (dose cumulativa variável de 30 a 150 mg/m²), apontou decréscimo significativo na relação E/A e aumento significativo de cTnI com a instituição do protocolo quimioterápico (GALLAY-LEPOUTRE; BÉLANGER; NADEAU, 2016).

2.5 Estresse oxidativo

Normalmente, em organismos saudáveis a produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS) é balanceada pelo sistema de defesa antioxidante, porém este saldo não é perfeito, havendo assim alguns danos continuamente. Dessarte, pode-se definir estresse oxidativo como o desequilíbrio entre a produção de ROS e defesas antioxidantes (HALLIWELL, 2007a).

As células possuem uma gama de respostas frente à exposição de ROS, abrangendo desde aumento na proliferação, prevenção de divisão celular, senescência, necrose, apoptose ou mecanismo de morte celular com características de ambos (HALLIWELL, 2007a). Por conseguinte, a baixa ou até mesmo a falta de defesas antioxidantes pode

predispôr ao desenvolvimento de câncer (HALLIWELL, 2007b), como a falta de dois tipos de glutathiona peroxidase propiciar câncer de intestino em camundongo (CHU et al., 2004) e a falta de catalase também poder levar ao desenvolvimento espontâneo de câncer de mama em camundongos (ISHII et al., 1996).

É relevante comentar que pelas diferentes formas de ação dos quimioterápicos (inibição das topoisomerasas, intervenção na replicação de DNA, bloqueio de formação de fuso mitótico, intervenção de suplemento de precursores de DNA, entre outras), a maioria deles podem causar estresse oxidativo e este que por consequência pode contribuir para otimizar seus efeitos antineoplásicos (HALLIWELL, 2007b).

Basicamente, a análise de estresse oxidativo pode ser feita pela avaliação de defesas endógenas através da atividade de metaloenzimas (glutathiona peroxidase, catalase e superóxido dismutase) e por testes que mensuram produtos finais específicos da interação das ROS com biomoléculas, como DNA, proteínas, lipídeos e aldeídos de baixo peso molecular. Pode-se citar o TBARS, que mensura substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, como teste de lipoperoxidação e sobre a oxidação proteica, pode-se destacar a técnica carbonil para proteínas carboniladas e tiol reduzido (grupamentos SH total) (PALMIERI; SBLENDORIO, 2007). O ensaio TRAP (potencial antioxidante reativo total) é, resumidamente, uma medição empírica da atividade antioxidante não enzimática no plasma e soro (VALKONEN; KUUSI, 1997; PALMIERI; SBLENDORIO, 2007).

A avaliação de estresse oxidativo em cães com neoplasias malignas foi executada por pesquisadores da área, principalmente com tumores de mama e linfoma (SZCZUBIAL et al., 2004; VAJDOVICH et al., 2005; WINTER et al., 2009; BOTTARI et al., 2015; MACHADO et al., 2015; JAYASRI; PADMAJA; SAIBABA, 2016).

Szczubial e colaboradores (2004) analisaram estresse oxidativo em cadelas com tumores de mama removidos cirurgicamente e categorizados histopatologicamente como benignos e malignos, e em cadelas sadias. Examinaram atividade das enzimas endógenas glutathiona peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD), as quais apresentaram maior atividade em cadelas com tumores malignos, do que nas com tumores benignos, porém sem diferença estatística. De antemão, estatisticamente houve diferença da GPx em cadelas com tumores malignos e nas sadias e de SOD em cadelas com tumores em geral e nas sadias. A concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e grupamentos SH total (proteicos e não proteicos) foram similares nos grupos analisados.

Um estudo comparou estresse oxidativo em cães com linfoma multicêntrico antes e após o fim de todo protocolo quimioterápico e também com cães saudáveis. Foram utilizadas as técnicas de mensuração de produtos proteicos de oxidação avançada (AOPP), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e poder antioxidante de redução férrico (FRAP). Foi observado que todos os parâmetros citados estavam elevados em comparação aos cães saudáveis e TBARS e AOPP permaneceram aumentados após o término do protocolo quimioterápico. Ainda assim, conseguiram ponderar que cães com linfoma em órgãos viscerais mostraram estresse oxidativo maior que cães com acometimento de alguns linfonodos (BOTTARI et al., 2015).

Agregando ao objetivo do trabalho, pode-se citar o estudo em pacientes com cardiopatia chagásica crônica e o uso de carvedilol na atenuação do estresse oxidativo. Foi examinado o desempenho de enzimas de defesa endógenas, principalmente, a glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD), além de aferição de concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), proteínas carboniladas, entre outras. Após seis meses de tratamento, houve diminuição significativa de proteínas carboniladas, diminuição não significativa de TBARS e redução generalizada do perfil enzimático, salientando significativa diminuição de atividade de SOD em todos os estágios da doença e de GPx no estágios mais iniciais (BUDNI et al., 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito cardioprotetor do carvedilol em cães, pacientes oncológicos, que necessitaram de quimioterapia com doxorubicina por meio de ensaio clínico randomizado controle placebo.

3.2 Objetivos específicos

a) Avaliar o efeito cardioprotetor do carvedilol por meio do exame de eletrocardiograma, analisando o traçado para pesquisa de arritmias e alterações eletrocardiográficas em relação a um grupo controle placebo.

b) Avaliar o efeito cardioprotetor do carvedilol por meio do exame de ecodopplercardiografia, analisando função sistólica e função diastólica em relação a um grupo controle placebo.

c) Avaliar o efeito cardioprotetor do carvedilol pela mensuração de Troponina I, marcador cardíaco de lesão de cardiomiócito em relação a um grupo controle placebo.

d) Avaliar o efeito antioxidante do carvedilol pela mensuração de alguns marcadores de estresse oxidativo em relação a um grupo controle placebo.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Os materiais e métodos empregados, bem como os resultados, serão apresentados a seguir na forma de artigo científico para submissão na revista *Research in Veterinary Science*.

1 **Evaluation of cardioprotective effect of carvedilol in dogs submitted to doxorubicin**
2 **chemotherapy: A prospective, randomized, double-blind, placebo control pilot study**

3
4 Eloisa Helena M. Pino^a, Matheus N. Weber^a, Luciana O. de Oliveira^a, Luciane C. Vieira^a,
5 Keylla Horbe Steffen dos Santos^a, Isabella Parussini Liu^a, Henrique M. Gomes^b, Anelise
6 Bonilla-Gerardi^a, Jose C. F. Moreira^b, Claudio W. Canal^a, Daniel G. Gerardi^a

7
8 ^a Division of Veterinary College, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre,
9 Rio Grande do Sul, Brazil

10 ^b Division of Biochemistry College, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto
11 Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

12
13 Abbreviations: CAR, carvedilol; CEUA, Ethic Commission for Use of Animals; cTnI,
14 troponin I; DOX, doxorubicin; ECG, electrocardiogram; EDT, mitral flow deceleration
15 time; EF, ejection fraction; EPSS, mitral valve E point to septal separation; ET, ejection
16 time; EV, endovenous; IVRT, isovolumic relaxation time; LVIDDN, normalized left
17 ventricular internal diameter in diastole; MAPSE, mitral annular plane systolic excursion;
18 PEP, pre-ejection time; ROS, reactive oxygen species; SF shortening fraction; TAPSE,
19 tricuspid annular plane systolic excursion; TAU, left ventricular diastolic time constant);
20 TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; TDI, pulsed-wave tissue Doppler
21 imaging; TRAP, the total reactive antioxidant potential.

22

23

24 **ABSTRACT**

25

26 The aim of this pilot study was to evaluate the protective effect of carvedilol in dogs with
27 cancer treated with doxorubicin for various malignancies. A prospective, randomized,
28 double-blind, placebo control study was performed in dogs treated with doxorubicin.
29 Thirteen dogs were randomized in two experimental groups consisting of 6 dogs in
30 carvedilol group and 7 dogs in placebo group. In the carvedilol group, 0.39mg/kg \pm 0.04
31 twice-daily oral carvedilol was started in the same day of first doxorubicin chemotherapy
32 and maintained during all chemotherapy protocol until last cardiological evaluation (15
33 days after last dose of doxorubicin). Cardiological evaluations (echocardiography,
34 electrocardiogram and blood pressure) were performed before doxorubicin administration
35 and every 10 to 15 days after each session of chemotherapy with doxorubicin (T0, T1, T2,
36 T3 e T4). Troponin I and oxidative stress tests were made with serum collected from dogs
37 at the initial and last cardiological evaluation (T0 e T4). Doppler study showed a
38 significant increase ($p = 0.001$) of mitral flow deceleration time (EDT) in the placebo
39 group and significant difference at E velocities ($p = 0.0482$), mitral flow deceleration time
40 (EDT) ($p = 0.0029$) and E/IVRT ratio ($p = 0.0155$) between groups. There was significant
41 difference ($p = 0.0326$) in R voltage at V4 precordial chest lead between groups and QT
42 interval had a significant increase ($p = 0.0269$) from baseline until end of chemotherapy in
43 placebo group. There was no significant difference in systolic parameters, blood pressure,
44 mortality, troponin I and oxidative stress tests. In conclusion, carvedilol group presented
45 best performance in diastolic function and depolarization and repolarization ventricular.
46 Therefore, we may suggest that carvedilol may have a beneficial effect in dog with cancer
47 receiving doxorubicin. More studies are needed to demonstrate the cardioprotective effect
48 of carvedilol against doxorubicin in dogs.

49

50

51

52 **Keywords:** Cardiotoxicity; Anthracyclines; Beta block; Canine; Oxidative stress.

53

54

55 **1. Introduction**

56

57 Doxorubicin has a powerful cytotoxic effect and is used to treat a wide spectrum of
58 human and animal malignancies; however its use can be limited due to adverse effects
59 caused by cumulative doses (Simunek et al., 2009; Tan et al., 1973). Cardiotoxicity is one
60 of the most known and irreversible adverse effects, which is basically caused by oxidative
61 stress and mitochondrial dysfunction (Doroshov, 1983). The incidence of doxorubicin-
62 induced cardiotoxicity differs according to breed in dogs, while development of clinical
63 cardiotoxicity varies from 4.0 to 18.3% (Hallman et al., 2019; Mauldin et al., 1992). In
64 high-risk breeds for developing dilated cardiomyopathy the incidence is 15.4% and in low-
65 risk breeds the incidence reaches 3.0% (Hallman et al., 2019).

66 Different studies have been done with use of doxorubicin and cardioprotective
67 effects of carvedilol and some had shown that carvedilol prevented the left ventricular
68 systolic and diastolic dysfunction, beyond structural and functional damage (Abuosa et al.,
69 2018; Kalay et al., 2006; Park and Steinberg, 2018; Santos et al., 2002; Zhang et al., 2019).
70 However, these studies were made with distinct species since mice until humans, but not in
71 dogs with cancer. Therefore, the aim of this clinical trial to evaluate the cardioprotective
72 effect of carvedilol in dogs.

73

74 **2. Material and methods**

75

76 The present study was approved by the Ethic Commission for Use of Animals
77 (CEUA) of the Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre – Rio Grande do Sul
78 – Brazil (protocol number 33878). The owners had signed a written consent form before
79 their dogs were included in the study.

80 This was a prospective, placebo-controlled, double blind, randomized clinical trial
81 of the cardioprotector effect of carvedilol in dogs submitted to doxorubicin chemotherapy.

82

83 2.1- Animal and experimental groups

84 The clinical study was conducted on client-owned dogs. The dogs were enrolled
85 from the Oncology Service of Veterinary Clinic Hospital of Federal University of Rio
86 Grande do Sul in Porto Alegre, Brazil. They were diagnosed with malignant tumors

87 (cytopathologically and/or histopathologically) and were treated with doxorubicin alone or
88 in association.

89 Dogs were considered eligible for the study if echocardiographic and
90 electrocardiographic examination did not reveal anatomic or functional abnormalities,
91 except mild valvar regurgitation. Patients classified in stage B1 of Canine Chronic
92 Valvular Heart Disease (Atkins et al., 2009) were accepted in the study. Exclusion criteria
93 included dogs with heart neoplasms or in treatment for heart diseases. In case of Canine
94 Chronic Valvular Heart Disease, patients classified in stage B2 and subsequent stages
95 (Atkins et al., 2009) were excluded.

96 Dogs were randomized in two experimental groups consisting of carvedilol group
97 (C) and placebo group (P) for ten months.

98

99 2.2- Doxorubicin administration

100 After administration of diphenhydramine (1 mg/kg EV), doxorubicin (DOX) was
101 given over 30 minutes through a venous catheter at a dosage of 30 mg/m² each 5 weeks in
102 dogs with lymphoma and each 21 days in dogs with other neoplasms.

103

104 2.3- Carvedilol and placebo administration

105 Study examiner and owners were blinded as to randomization. In the carvedilol
106 group, the established dose of 0.3-0.4 mg/kg twice-daily oral carvedilol (CAR) was started
107 in the same day of first doxorubicin chemotherapy and maintained during all chemotherapy
108 protocol until last cardiological evaluation. Placebo (tablet with standard adjuvants) was
109 administered according to the calculated daily dose for carvedilol, divided into two
110 administrations and provided in the same period. Dose of study medication was not
111 adjusted throughout the study.

112

113 2.4- Echocardiography

114 Echocardiographic evaluations were performed in unsedated animals before
115 doxorubicin administration (T0) and every 10 to 15 days after each session of
116 chemotherapy with doxorubicin (T1, T2, T3 e T4). Echocardiograms were performed by
117 the same examiner in right and left lateral position with an echocardiography machine¹
118 equipped with two sectors transducers ranging from 1 to 10 MHz and followed the
119 conventional standards and recommendation (Boon, 2011; Thomas et al., 1993).

120 Measurements of ejection fraction (EF), shortening fraction (SF), mitral valve E
121 point to septal separation (EPSS), left ventricular systolic and diastolic diameters and
122 thickness were performed in the M-mode using the right parasternal short-axis view.
123 Ejection and shortening fraction were obtained by Teichholz formula and normalized left
124 ventricular internal diameter in diastole (LVIDDN) according to Cornell and collaborators
125 (2004).

126 All valves were examined with color-Doppler to detect insufficiency. Velocities
127 over the aortic and pulmonary valves were measured with pulsed-wave Doppler.
128 Continuous-wave Doppler was used to measure velocities of mitral or tricuspid
129 insufficiency.

130 In transmitral pulsed Doppler examination, the peak velocities of early (E) and late
131 diastolic flow (A), the E/A ratio, mitral flow deceleration time (EDT) and isovolumetric
132 relaxation time (IVRT) were measured. The peak velocities of early (E') and late diastolic
133 motion (A'), the ratio E'/A' and the ratio E/E' were obtained with pulsed-wave tissue
134 Doppler imaging (TDI) at the mitral annulus on an apical four-chamber view.

135 Left atrium (LA) and aortic (Ao) root and LA/Ao ratio were calculated from 2-
136 dimensional (2D) loops obtained from the right parasternal short axis views.

137 Mitral annular plane systolic excursion (MAPSE) and tricuspid annular plane
138 systolic excursion (TAPSE) were evaluated in the M-mode using the left apical parasternal
139 four-chamber view.

140

141 2.5- Electrocardiogram

142 Standard 10-lead ECG (leads I, II, III, aVR, aVL, aVF, rV2, V2, V4 and V10) were
143 recorded for three minutes for all dogs with a computer-based ECG monitor² with a speed
144 of 50mm/s, calibrated for 10mm/mV. Exams were performed in the right lateral recumbent
145 position at first day of cardiological evaluation (T0) and every 10 to 15 days after
146 doxorubicin administration (T1, T2, T3 and T4).

147 ECGs were evaluated by the same examiner for heart rate, rhythm, cardiac mean
148 electrical axis, PR and QT intervals, duration and amplitude of P wave and QRS complex,
149 ST segment, T wave and precordial chest leads.

150

151 2.6- Blood pressure

152 The arterial blood pressure was measured indirectly by vascular Doppler³ by the
153 same examiner, with the dog in lateral recumbence recumbence in accordance with
154 previous published guidelines (Brown, 2007). The cuff width was approximately 40% of
155 the limb circumference. Each value of systolic arterial blood pressure was calculated by the
156 mean of five measurements. The blood pressures were done in the same days of
157 echocardiographys and electrocardiograms (T0, T1, T2, T3 and T4).

158

159 2.7- Troponin I analysis

160 At the initial and last cardiological evaluation (T0 e T4), approximately 4mL of
161 venous blood were collected from jugular vein and aliquoted in serum tubes. Samples were
162 centrifuged (3,000 x g for 10 minutes) and serum were collected, aliquoted, and stored in
163 eppendorf tubes in -80°C until analysis.

164 Serum cTnI concentration was determined by a human assay⁴ validated for use in
165 canine blood sample (Langhorn et al., 2018; O'Brien et al., 2006). The analytical
166 sensitivity was 0.1 ng/mL and reportable interval was 0.2 until 180 ng/mL. The samples
167 were run in duplicate and results were provided on average.

168

169 2.8- Oxidative stress measurements

170 Oxidative stress tests were performed in biochemical lab specialized in the area.
171 Samples were collected and stored like samples for troponin I analysis.

172 Lipid peroxidation through thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) was
173 measured in serum by spectrophotometry at 532 nm⁵ as described by Esterbauer and
174 Cheeseman (1990).

175 Oxidation of proteins was evaluated through assay of carbonyl in protein and read
176 at 370 nm⁵ like Levine and contributors (1990).

177 The total reactive antioxidant potential (TRAP assay – Total [peroxyl] Radical-
178 trapping Antioxidant Parameter) was used as an index of non-enzymatic antioxidant
179 capacity of samples after treatment, based on Lissi and contributors (1992) and Dresch and
180 contributors (2009).

181

182 2.9- Statistical analysis

183 Electrocardiography (heart rate; PR interval; QRS complex; QT interval; R wave
184 amplitude; R amplitude and S amplitude at precordial chest leads; P wave duration and

185 amplitude), echocardiography (peak E velocity; peak A velocity; E/A ratio; EDT; IVRT;
186 E/IVRT ratio; peak E' velocity ; peak A' velocity; E'/A' ratio; E/E' ratio; ejection fraction
187 (EF); shortening fraction (SF); mitral valve E point to septal separation (EPSS); left
188 ventricular diastolic and systolic diameters and thickness (LVDd; LVSd; LVPWd;
189 LVPWS; IVSd; IVSs); LVIDDN; TAPSE; MAPSE; LA and Ao root; LA/Ao ratio; aortic
190 and pulmonary flow), blood pressure, oxidative stress variables (TBARS, carbonyl and
191 TRAP assay) and troponin I parameters were evaluated using the unpaired Student's t-test.
192 Mann-Whitney test was performed for values with non-normal distribution (mortality and
193 some baseline parameters). Differences were evaluated between groups (placebo and
194 carvedilol) and within group analyzing baseline and after last chemotherapy (CT). P-values
195 less than 0.05 were considered significant. Analyses and graphs were drawn using a
196 commercially available software⁶.

197

198 **3. Results**

199

200 The baselines characteristics are shown in Table 1. Thirty-two dogs were recruited
201 into the study, but only thirteen were enrolled. Reasons for exclusion involved heart
202 diseases, arrhythmias, initial systolic dysfunction, withdrawal and treatment failure. Six
203 were randomized to carvedilol and seven to placebo. Four dogs were diagnosed with
204 mammary carcinomas, four dogs with lymphoma, three dogs with sarcomas, one dog with
205 splenic hemangiosarcoma and one with transmissible venereal tumor. There were seven
206 dogs with three administrations of doxorubicin (cumulative dose 90 mg/m²) and six dogs
207 with four administrations (cumulative dose 120 mg/m²). The mean dose of carvedilol was
208 0.39 mg/kg \pm 0.04 twice daily. Dogs with lymphoma also had received cyclophosphamide,
209 vincristine and prednisone. Every dog had received ranitidine and ondansetron at home, as
210 a prescription after chemotherapy, and dipyrone if there were clinical manifestations of
211 pain.

212 Most of the dogs were middle-age to advanced-age (mean 8.8 years, range: 3 to 14
213 years). Breeds represented included mixed breed (n=4), Brazilian Terrier (n=2) and Boxer,
214 Brazilian Dogo, German Shepherd, Belgian Shepherd (Malinois), Poodle, Pug and
215 Rottweiler (n=1 each). There were 11 females (84.6%) and 2 males (15.4%).

216

217 **3.1- Mortality**

218 All 13 dogs completed the cardiac evaluations. After that, there were 5 deaths. Two
219 deaths occurred on carvedilol group and both were euthanized due cancer progression.
220 Other three deaths on placebo were attributed to end stage cancer (one was euthanized and
221 other died at home) and the last one died (4 months after end of chemotherapy) with
222 respiratory difficulty at home, but it is not known the cause. Mortality rates between the
223 two groups were not significantly different ($p = 0.80$).

224

225 3.2- Echocardiography

226 Doppler study showed a significant increase ($p = 0.001$) of mitral flow deceleration
227 time (EDT) in the placebo group, but still within the normality value for dogs (Table 2).

228 There was significant difference at E velocities ($p = 0.0482$), mitral flow deceleration time
229 (EDT) ($p = 0.0029$) and E/IVRT ratio ($p = 0.0155$) between groups (Figure 1 A, B and C).

230 There was no significant difference in systolic and other parameters in both groups
231 along the study. Comparison of systolic parameters in groups is shown in Table 3.

232

233 3.3- Electrocardiogram

234 The predominant rhythm in both groups was sinus arrhythmia. There were no
235 arrhythmias at recording times. Table 4 shows electrocardiographic parameters of both
236 groups.

237 There was significant difference ($p = 0.0326$) in R voltage at V4 precordial chest
238 lead between groups (Figure 1 D). And QT interval had a significant increase ($p = 0.0269$)
239 from baseline until end of chemotherapy in placebo group (Figure 2).

240

241 3.4- Blood pressure

242 No significant difference in the blood pressure between groups were found along
243 the treatment, as well as before and after chemotherapy in the same group (Figure 3 A).

244

245 3.5- Troponin I analysis

246 At baseline, serum troponin I (cTnI) was equal to or less than 0.2 ng/mL in every
247 dog from placebo group (mean: $0.19 \text{ ng/mL} \pm 0.03$) and four of six dogs from carvedilol
248 group (mean: $0.26 \text{ ng/mL} \pm 0.13$).

249 The mean of troponin I levels increased from baseline until the end of the study in
250 both groups. However, there was no significant difference, as well as comparison between
251 groups (Figure 3 B).

252 Although there were no significant changes, three of the five dogs that died were
253 the only ones that showed changes in cTnI. Two dogs were from carvedilol (one showed
254 before CT $0.26 \text{ ng/mL} \pm 0.003$ and after CT $0.59 \text{ ng/mL} \pm 0.033$ and another showed
255 before CT $0.54 \text{ ng/mL} \pm 0.041$ and after CT $0.32 \text{ ng/mL} \pm 0.015$) and one was from
256 placebo (before CT $0.19 \text{ ng/mL} \pm 0.001$ and after CT $1.07 \text{ ng/mL} \pm 0.001$). The dog that
257 died due to respiratory distress did not present alteration in cTnI (neither in baseline and
258 post chemotherapy).

259

260 3.6- Oxidative stress measurements

261 Oxidative stress tests TBARS, carbonyl and TRAP did not show significant
262 changes between groups and from baseline until after chemotherapy in both groups.
263 Results are shown in Figure 4.

264

265 4. Discussion

266

267 The aim of this clinical trial was evaluate if carvedilol has a protective effect
268 against doxorubicin-induced cardiotoxicity specifically in dogs with cancer. Only one
269 study was found with this features, but with experimental healthy dogs who received
270 doxorubicin directly into coronary circulation. This study concluded that carvedilol had a
271 cardioprotective effect because it maintained systemic arterial pressure, heart rate
272 variability and PEP/ET ratio (pre-ejection time/ejection time), which indicates an index of
273 systolic function. In addition, it minimized QT interval prolongation and TAU (left
274 ventricular diastolic time constant), which was used to assess diastolic function
275 (Sawangkoon, 2002).

276 The baselines characteristics in Table 1 may show a higher cumulative dose in
277 placebo group than in carvedilol group (150 mg/m^2 more), although it did not present
278 statistical difference due to the small number of animals. On the other hand, high-risk
279 breeds were more frequent in carvedilol group (49.98%) than in placebo group (28.56%),
280 despite the small number of dogs to measure fidigne difference.

281 In the present study, mortality rates between groups were not statistically different.
282 This may be explained by the limited number of dogs as well as in another placebo
283 controlled clinical trial with 25 human patients with cancer, which evaluated the
284 cardioprotective effect of carvedilol with six month of follow-up (Kalay et al., 2006) and by
285 the low cumulative dose of DOX (90-120mg/m²), which is less associated with clinical
286 cardiotoxicity (Hallman et al., 2019).

287 There was no significant difference in systolic parameters in both groups. Some
288 studies have demonstrated that diastolic function change was earlier than systolic
289 dysfunction in some oncologic patients treated with doxorubicin; therefore, it may suggest
290 that filling indexes of diastolic function may be more sensitive than variables of systolic
291 function (Galderisi et al., 2007; Marchandise et al., 1989; Stoddard et al., 1992; Tjeerdsma
292 et al., 1999). Nevertheless, some parameters of systolic function were not used, such as
293 Simpson's rule (Avila et al, 2018), TEI index and systolic time intervals (Sousa et al.,
294 2014); therefore, the possibility of false negative in relation to systolic parameters can not
295 be excluded.

296 The mitral flow deceleration time (EDT) increased significantly in the placebo
297 group, as in women and children who treated with doxorubicin (Dorup et al., 2004; Shaikh
298 et al., 2013; Tjeerdsma et al., 1999). Thereby, there was a significant difference comparing
299 two groups, increasing EDT in placebo and decreasing in carvedilol. The peak early
300 velocity (E) presented a statistical difference between groups. And consequently, this
301 reflected in the E/IVRT ratio that also presented statistical difference when comparing the
302 groups. E wave decreased in carvedilol and increased in placebo, like that E/IVRT. Similar
303 result happened with Dorup and coauthors (2004) in the evaluation of children following
304 anthracycline therapy. And although it is difficult to explain, they suggest a directional
305 shift towards impaired relaxation (despite E wave is increased) rather than a change
306 towards a restrictive filling pattern. Ventricular relaxation is a complex energy-dependent
307 process, which the contractile elements are deactivated and the myofibrils return to their
308 original length. It begins during midsystole and continues throughout the first third of
309 diastolic filling. In other words, ventricular relaxation can be translated as period of the
310 decrease in left ventricular pressure after systole (Nishimura and Tajik, 1999). Since E
311 velocity is also influenced by left atrial pressure at mitral valve opening and left atrial
312 compliance, in addition to left ventricular pressure at onset of diastole as EDT, we may
313 suggest that the increase in EDT followed the path of abnormal relaxation, as well as E

314 velocity, but this was influenced by other factors that may be justified by loss of
315 myofibrils, distention of sarcoplasmic reticulum and vacuolization of the cytoplasm
316 (Chatterjee et al., 2010) that affects the heart as a whole (atria and ventricles).

317 QT interval had a significant increase from baseline until end of chemotherapy in
318 placebo group, but still within the normality value for dogs. In agreement with other
319 findings (Sawangkoon, 2002; Hazari et al., 2009; Xin et al., 2011), this may indicate
320 possible changes in depolarization and repolarization ventricular caused by doxorubicin.

321 Curiously, R wave increase in the precordial V4/CV6LU was not found in others
322 papers on the subject in dogs. Most of studies focused on echocardiography and those with
323 electrocardiogram used only 6 leads (Gallay-Lepoutre et al., 2016; Ratterree et al., 2012;
324 Souza and Camacho, 2006). Surachetpong et al. (2016) used 12 leads; however they did
325 not focus on the measurement of the R and S wave amplitudes at precordial chest leads. A
326 possible explanation for our finding may be based on past studies about myocardial
327 ischemia, since dogs of our study did not present left ventricular hypertrophy and
328 hypertension (Cumming and Proudfit, 1959; David et al., 1981; Georgopoulos et al., 1961).
329 Controversially, studies showed that there was decrease R wave in right precordial leads in
330 patients treated with anthracycline, suggesting injury to myocardial cells (Onouchi et al.,
331 1988; Umemoto et al., 1993).

332 Some studies have shown that troponin I levels increased in dogs with several
333 neoplasms when submitted to doxorubicin treatment, as well as the dogs in our study
334 (Gallay-Lepoutre et al., 2016; Selting et al., 2004; Surachetpong et al., 2016). Despite the
335 short follow-up time, we may agree that elevation of cTnI did not necessarily follow the
336 clinical signs of cardiomyopathy (Selting et al., 2004). On the other hand, our dogs did not
337 show systolic dysfunction; however, we cannot yet predict that an indicator of early
338 myocardial injury such as cTnI, could not be linked to likely future cardiac damage
339 (Surachetpong et al., 2016).

340 Both tumor cells and chemotherapeutic drugs are responsible for oxidative stress,
341 through the imbalance of ROS (reactive oxygen species) production and endogenous
342 antioxidant defenses (Klaunig and Kamendulis, 2004) and some studies have shown this in
343 dogs (Bottari et al., 2015; Winter et al., 2009). Other studies have shown the antioxidant
344 properties of carvedilol against doxorubicin in vitro (Spallarossa et al., 2004) and in rats
345 (Matsui et al., 1999). Although, we did not find meaningful results in biochemical tests
346 (TBARS, carbonyl and TRAP) to prove this effect. This can be justified by the lack of

347 standardization of the feeding (Sechi et al, 2017), controlled environment and genetic
348 (Russo and Bracarense, 2016).

349 We did not find significant changes in blood pressure, cTnI levels and biochemical
350 tests. Perhaps the lack of standardization may have contributed for study limitations,
351 such as same cumulative dose of DOX, type of cancer, concomitant medications, beyond a
352 longer follow-up time and a greater number of dogs.

353 In addition to the small number of dogs in our survey, the ideal dose of carvedilol
354 to cardioprotection for dogs is unknown; therefore the dose of carvedilol may have
355 contributed to not having achieved remarkable results. In healthy dogs, doses ranging from
356 0.08-1.5 mg/kg twice daily have been reported (Abbott et al., 2005; Gordon et al., 2006).
357 We used the dose that was used in dogs with experimental heart disease (0.3-0.4 mg/kg
358 q12h) (Marcondes-Santos et al., 2007; Oyama et al., 2007; Soares et al., 2010).
359 Furthermore, the ideal beginning of carvedilol administration is also unknown, some
360 studies started on the same day of chemotherapy (Santos et al., 2002; Spallarossa et al.,
361 2004) and others a prior period (Matsui et al., 1999; Zhang et al., 2019).

362

363 **5. Conclusions**

364

365 In conclusion, carvedilol group presented best performance in diastolic function
366 and ventricular depolarization and repolarization. Therefore, we may suggest that
367 carvedilol may have a beneficial effect in dog with cancer receiving doxorubicin. More
368 studies are needed to demonstrate the cardioprotective effect of carvedilol against
369 doxorubicin in dogs, especially in the prevention of oxidative stress and in systolic
370 evaluation.

371

372

373 Conflict of interest statement

374

375 None of the authors of this manuscript has any conflict of interest.

376

377 Acknowledgements

378

379 The authors thank Leticia Scherer Koester and her postgraduate students, from the
380 Federal University of Rio Grande do Sul, for placebo tablets and Vet Análises lab,
381 specially, Helena Domingues e Natália Angeli, for Troponin I tests. Conselho Nacional de
382 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do
383 Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
384 Superior (CAPES) and Propesq/UFRGS supported this study.

385

386 ¹ Mylab 40VET, Esaote Healthcare, Florence, Italy.387 ² ECG-PC, version 6.2, Tecnologia Eletrônica Brasileira, São Paulo, Brazil.388 ³ Doppler Vascular DV 610V, Medmega – Indústria de Equipamentos Médicos, São Paulo, Brazil.389 ⁴ Immulite 1000 troponin I, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Deerfield, IL, USA.390 ⁵ SpectraMax i3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA.391 ⁶ GraphPad Prims version 5 Software, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA.

392

393

394 **References**

395

- 396 Abbott, J.A., Broadstone, R. V, Ward, D.L., Pyle, R.L., 2005. Hemodynamic effects of
 397 orally administered carvedilol in healthy conscious dogs. *Am. J. Vet. Res.* 66, 637–
 398 641.
- 399 Abuosa, A.M., Elshiekh, A.H., Qureshi, K., Abrar, M.B., Kholeif, M.A., Kinsara, A.J.,
 400 Andejani, A., Ahmed, A.H., Cleland, J.G.F., 2018. Prophylactic use of carvedilol to
 401 prevent ventricular dysfunction in patients with cancer treated with doxorubicin.
 402 *Indian Heart J.* 70, 96–100. <https://doi.org/10.1016/j.ihj.2018.06.011>
- 403 Atkins, C., Bonagura, J., Ettinger, S., Fox, P., Gordon, S., Haggstrom, J., Hamlin, R.,
 404 Keene, B., Stepien, R., 2009. Guidelines for the diagnosis and treatment of canine
 405 chronic valvular heart disease. *J. Vet. Intern. Med.* 23, 1142–1150.
- 406 Avila, M.S., Ayub-ferreira, S.M., Wanderley Junior, M.R.B., Cruz, F.D., Brandão, S.M.G.,
 407 Rigaud, V.O.C.C., Higushi-Dos-Santos, M., Hajjar, L.A., Kalil Filho, R., Hoff,
 408 P.M., Sahade, M., Ferrari, M.S.M., Costa, R.L.P., Mano, M.S., Cruz, C.B.B. V,
 409 Abduch, M.C., Alves, M.S.L., Guimaraes, G.V., Issa, V.S., Bittencourt, M.S.,
 410 Bocchi, E.A., 2018. Carvedilol for Prevention of Chemotherapy-Related
 411 Cardiotoxicity: The CECCY Trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* 71, 2281–2290.
 412 <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.02.049>
- 413 Boon, J.A., 2011. *Veterinary Echocardiography*, 2nd ed. Wiley-Blackwell, Ames.
- 414 Bottari, N.B., Munhoz, T.D., Torbitz, V.D., Tonin, A.A., Anai, L.A., Semolin, L.M.S.,
 415 Jark, P.C., Bollick, Y.S., Moresco, R.N., França, R.T., Lopes, S.T.A., Stefani,
 416 L.M., Silva, A.S. Da, Lopes, S.T.A., Stefani, L.M., Tinucci-costa, M., Silva, A.S.
 417 Da, 2015. Oxidative stress in dogs with multicentric lymphoma : Effect of
 418 chemotherapy on oxidative and antioxidant biomarkers. *Redox Rep.* 20, 267–274.
 419 <https://doi.org/10.1179/1351000215Y.0000000037>
- 420 Brown, S., Atkins, C., Bagley, R., Carr, A., Cowgill, L., Davidson, M., Egner, B., Elliott,
 421 J., Henik, R., Labato, M., Littman, M., Polzin, D., Ross, L., Snyder, P., Stepien, R.,
 422 2007. Guidelines for the Identification, Evaluation, and Management of Systemic
 423 Hypertension in Dogs and Cats. *J. Vet. Intern. Med.* 21, 542–558.
- 424 Chatterjee, K., Zhang, J., Honbo, N., Karliner, J.S., 2010. Doxorubicin Cardiomyopathy.
 425 *Cardiology* 115, 155–162. <https://doi.org/10.1159/000265166>
- 426 Cornell, C.C., Kittleson, M.D., Torre, P. Della, Haggstrom, J., Lombard, C.W., Pedersen,
 427 H.D., Vollmar, A., Wey, A., 2004. Allometric Scaling of M-mode Cardiac
 428 Measurements in Normal Adult Dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 18, 311–321.
- 429 Cumming, G.R., Proudfit, W.L., 1959. High-Voltage QRS Complexes in the Absence of
 430 Left Ventricular Hypertrophy. *Circulation* 19, 406–408.
- 431 David, D., Naito, M., Chen, C.C., Michelson, E.L., Morganroth, J., Schaffenburg, M.,
 432 1981. R-wave Amplitude Variations During Acute Experimental Myocardial
 433 Ischemia: An Inadequate Index for Changes in Intracardiac Volume. *Circulation* 63.
- 434 Doroshov, J.H., 1983. Effect of Anthracycline Antibiotics on Oxygen Radical Formation
 435 in Rat Heart. *Cancer Res.* 43, 460–472.
- 436 Dorup, I., Levitt, G., Sullivan, I., Sorensen, K., 2004. Prospective longitudinal assessment
 437 of late anthracycline cardiotoxicity after childhood cancer: the role of diastolic
 438 function. *Heart* 90, 1214–1216. <https://doi.org/10.1136/hrt.2003.027516>
- 439 Dresch, M.T.K., Rossato, S.B., Kappel, V.D., Biegelmeier, R., Hoff, M.L.M., Mayorga,
 440 P., Zuanazzi, J.A.S., Henriques, A.T., Moreira, J.C.F., 2009. Optimization and

- 441 validation of an alternative method to evaluate total reactive antioxidant potential.
442 *Anal. Biochem.* 385, 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.10.036>
- 443 Esterbauer, H., Cheeseman, K.H., 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation
444 products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 186, 407–421.
- 445 Galderisi, M., Marra, F., Esposito, R., Lomoriello, V.S., Pardo, M., Divitiis, O. De, 2007.
446 Cancer therapy and cardiotoxicity: The need of serial Doppler echocardiography.
447 *Cardiovasc. Ultrasound* 5, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1476-7120-5-4>
- 448 Gallay-Lepoutre, J., Bélanger, M.C., Nadeau, M.E., 2016. Prospective evaluation of
449 Doppler echocardiography, tissue Doppler imaging and biomarkers measurement
450 for the detection of doxorubicin-induced cardiotoxicity in dogs: A pilot study. *Res.*
451 *Vet. Sci.* 105, 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.02.001>
- 452 Georgopoulos, A.J., Vlastaris, P.A., Proudfit, W.L., 1961. R-wave voltage changes in
453 relation to arterial pressure in hypertensive patients. *Cleve. Clin. Q.* 28, 46–50.
- 454 Gordon, S.G., Arsenault, W.G., Longnecker, M., Boothe, D.M., Miller, M.W., Chalkley,
455 J., 2006. Pharmacodynamics of Carvedilol in Conscious, Healthy Dogs. *J. Vet.*
456 *Intern. Med.* 20, 297–304.
- 457 Hallman, B.E., Hauck, M.L., Williams, L.E., Hess, P.R., Suter, S.E., 2019. Incidence and
458 risk factors associated with development of clinical cardiotoxicity in dogs receiving
459 doxorubicin. *J. Vet. Intern. Med.* 1–9. <https://doi.org/10.1111/jvim.15414>
- 460 Hazari, M.S., Haykal-Coates, N., Winsett, D.W., Costa, D.L., Farraj, A.K., 2009.
461 Continuous Electrocardiogram Reveals Differences in the Short-Term Cardiotoxic
462 Response of Wistar-Kyoto and Spontaneously Hypertensive Rats to Doxorubicin.
463 *Toxicol. Sci.* 110, 224–234. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp092>
- 464 Kalay, N., Basar, E., Ozdogru, I., Er, O., Cetinkaya, Y., Dogan, A., Inanc, T., Oguzhan, A.,
465 Eryol, N.K., Topsakal, R., Ergin, A., 2006. Protective effects of carvedilol against
466 anthracycline-induced cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 48, 2258–2262.
467 <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.07.052>
- 468 Klaunig, J.E., Kamendulis, L.M., 2004. The Role of Oxidative Stress in Carcinogenesis.
469 *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44, 239–267.
470 <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121851>
- 471 Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W.,
472 Shaltiel, S., Stadtman, E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively
473 modified proteins. *Methods Enzymol.* 186, 464–478.
- 474 Lissi, E., Pascual, C., Del Castillo, M.D., 1992. Luminol Luminescence Induced by 2, 2'-
475 Azo-Bis (2- Amidinopropane) Thermolysis. *Free Radic. Res. Commun.* 17, 299–
476 311. <https://doi.org/10.3109/10715769209079523>
- 477 Marchandise, B., Schroeder, E., Bosly, A., Doyen, C., Weynants, P., Kremer, R., Pouleur,
478 H., 1989. Early detection of doxorubicin cardiotoxicity: Interest of Doppler
479 echocardiographic analysis of left ventricular filling dynamics. *Am. Heart J.* 118,
480 92–98.
- 481
- 482 Marcondes-Santos, M., Tarasoutchi, F., Mansur, A.P., Strunz, M.C., 2007. Effects of
483 Carvedilol Treatment in Dogs with Chronic Mitral Valvular Disease. *J. Vet. Intern.*
484 *Med.* 21, 996–1001.
- 485 Matsui, H., Morishima, I., Numaguchi, Y., Toki, Y., Okumura, K., Hayakawa, T., 1999.
486 Protective Effect of Carvedilol against Doxorubicin-induced Cardiomyopathy in
487 Rats. *Life Sci.* 65, 1265–1274.

- 488 Mauldin, G.E., Fox, P.R., Patnaik, A.K., Bond, B.R., Mooney, S.C., Matus, R.E., 1992.
489 Doxorubicin-Induced Cardiotoxicosis. Clinical Features in 32 Dogs. *J. Vet. Intern.*
490 *Med.* 6, 82–88.
- 491 Nishimura, R.A., Tajik, A.J., 1999. Evaluation of Diastolic Filling of Left Ventricle in
492 Health and Disease: Doppler Echocardiography is the Clinician's Rosetta Stone. *J.*
493 *Am. Coll. Cardiol.* 30, 8–18.
- 494 Onouchi, Z., Tamiya, H., Sakakibara, Y., Ando, M., Fujimoto, T., 1988. R-wave voltage in
495 the right precordial leads in anthracycline cardiomyopathy: a clinical study. *Int. J.*
496 *Clin. Pharmacol. Res.* 8, 423–431.
- 497 Oyama, M.A., Sisson, D.D., Pros, R., Bulmer, B.J., Luethy, M.W., Fuentes, V.L., 2007.
498 Carvedilol in Dogs with Dilated Cardiomyopathy. *J. Vet. Intern. Med.* 21, 1272–
499 1279.
- 500 Park, M., Steinberg, S.F., 2018. Carvedilol Prevents Redox Inactivation of Cardiomyocyte
501 B1-Adrenergic Receptors. *JACC Basic to Transl. Sci.* 3, 521–532.
502 <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2018.06.002>
- 503 Ratterree, W., Gieger, T., Pariaut, R., Saelinger, C., Strickland, K., 2012. Value of
504 Echocardiography and Electrocardiography as Screening Tools Prior to
505 Doxorubicin Administration. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 48, 89–96.
506 <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-5680>
- 507 Russo, C., Bracarense, A.P.F.R.L., 2016. Oxidative stress in dogs. *Semin. Ciências*
508 *Agrárias* 37, 1431–1439. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n3p1431>
- 509 Santos, D.L., Moreno, A.J.M., Leino, R.L., Froberg, M.K., Wallace, K.B., Phar-, K.B.T.A.,
510 2002. Carvedilol Protects against Doxorubicin-Induced Mitochondrial
511 Cardiomyopathy. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 185, 218–227.
512 <https://doi.org/10.1006/taap.2002.9532>
- 513 Sawangkoon, S., 2002. Potential for carvedilol to modify doxorubicin cardiotoxicity. The
514 Ohio State University.
- 515 Sechi, S., Fiore, F., Chiavolelli, F., Dimauro, C., Nudda, A., Cocco, R., 2017. Oxidative
516 stress and food supplementation with antioxidants in therapy dogs. *Can. J. Vet. Res.*
517 81, 206–216.
- 518 Selting, K.A., Lana, S.E., Ogilvie, G.K., Olmstead, A., Mykles, D.L., Bright, J.,
519 Richardson, K.L., Walton, J.A., Monnet, E., Fettman, M.J., 2004. Cardiac troponin
520 I in canine patients with lymphoma and osteosarcoma receiving doxorubicin :
521 comparison with clinical heart disease in a retrospective analysis. *Vet. Comp.*
522 *Oncol.* 2, 142–156.
- 523 Shaikh, A.S., Saleem, A.F., Mohsin, S.S., Alam, M.M., Ahmed, M.A., 2013.
524 Anthracycline-induced cardiotoxicity: prospective cohort study from Pakistan. *BMJ*
525 *Open* 3, 1–6. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2013-003663>
- 526 Simunek, T., Sterba, M., Popevolá, O., Adamcová, M., Hrdina, R., Gersl, V., 2009.
527 Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of
528 oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol. Reports* 61, 154–171.
- 529 Soares, E.C., Pereira, G.G., Petrus, L.C., Neto, M.L., Yamaki, F.L., 2010. Survival and
530 echocardiographic evaluation of dogs with idiopathic dilated cardiomyopathy
531 treated with carvedilol. *Arq. Bras. Med. Veterinária e Zootec.* 62, 555–563.
- 532 Sousa, M.G., Paulino-Junior, D., Pascon, J.P.E., Pereira-Neto, G.B., Carareto, R.,
533 Camacho, A.A., 2014. Assesment of the TEI index of myocardial performance in
534 dogs with doxorubicin-induced cardiomiopathy. *Arch. Med. Vet.* 46, 63–68.

- 535 Souza, R.C.A., Camacho, A.A., 2006. Neurohormonal, hemodynamic, and
536 electrocardiographic evaluations of healthy dogs receiving long-term administration
537 of doxorubicin. *Am. J. Vet. Res.* 67, 1319–1325.
- 538 Spallarossa, P., Garibaldi, S., Altieri, P., Fabbi, P., Manca, V., Nasti, S., Rossettin, P.,
539 Ghigliotti, G., Ballestrero, A., Patrone, F., Barsotti, A., Brunelli, C., 2004.
540 Carvedilol prevents doxorubicin-induced free radical release and apoptosis in
541 cardiomyocytes in vitro. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 37, 837–846.
542 <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2004.05.024>
- 543 Stoddard, M.F., Seeger, J., Liddell, N.E., Hadley, T.J., Sullivan, D.M., Kupersmith, J.,
544 1992. Prolongation of Isovolumetric Relaxation Time as Assessed by Doppler
545 Echocardiography Predicts Doxorubicin-induced Systolic Dysfunction in Humans.
546 *J. Am. Coll. Cardiol.* 20, 62–69. [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(92\)90138-D](https://doi.org/10.1016/0735-1097(92)90138-D)
- 547 Surachetpong, S.D., Teewasutrakul, P., Rungsipat, A., 2016. Serial measurements of
548 cardiac troponin I (cTnI) in dogs treated with doxorubicin. *Jpn. J. Vet. Res.* 64,
549 221–233. <https://doi.org/10.14943/jjvr.64.4.221>
- 550 Tan, C., Etcubanas, E., Wollner, N., Rosen, G., Gilladoca, A., Showel, J., Murphy, M.L.,
551 Krakoff, I.H., 1973. Adriamycin - an antitumor antibiotic in the treatment of
552 neoplastic diseases. *Cancer* 32, 9–17.
- 553 Thomas, W.P., Gaber, C.E., Jacobs, G.J., Kaplan, P.M., Lombard, C.W., Moise, N.S.,
554 Moses, B.L., 1993. Recommendations for Standards in Transthoracic Two-
555 Dimensional Echocardiography in the Dog and Cat. *J. Vet. Intern. Med.* 7, 247–
556 252. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.1994.tb01588.x>
- 557 Tjeerdsma, G., Meinardi, M.T., van der Graaf, W.T.A., van den Berg, M.P., Mulder, N.H.,
558 Crijns, H.J.G.M., de Vries, E.G.E., van Veldhuisen, D.J., 1999. Early detection of
559 anthracycline induced cardiotoxicity in asymptomatic patients with normal left
560 ventricular systolic function : autonomic versus echocardiographic variables. *Heart*
561 81, 419–423.
- 562 Umemoto, M., Azuma, E., Itoh, M., Komada, Y., Ido, M., Kawasaki, H., Kita, H., Sakurai,
563 M., 1993. Low R-wave Amplitude in the Right Precordial Leads in Children with
564 Symptomatic Doxorubicin Cardiomyopathy. *Pediatr. Cardiol.* 14, 107–108.
- 565 Winter, J.L., Barber, L.G., Freeman, L., Griessmayr, P.C., Milbury, P.E., Blumberg, J.B.,
566 2009. Antioxidant Status and Biomarkers of Oxidative Stress in Dogs with
567 Lymphoma. *J. Vet. Intern. Med.* 23, 311–316.
- 568 Xin, Y., Zhang, S., Gu, L., Liu, S., Gao, H., You, Z., Zhou, G., When, L., Yu, J., Xuan, Y.,
569 2011. Electrocardiographic and Biochemical Evidence for the Cardioprotective
570 Effect of Antioxidants in Acute Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in the Beagle
571 Dogs. *Biol. Pharm. Bull.* 34, 1523–1526.
- 572 Zhang, Q.-L., Yang, J.-J., Zhang, H.-S., 2019. Carvedilol (CAR) combined with carnolic
573 acid (CAA) attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity by suppressing excessive
574 oxidative stress, inflammation, apoptosis and autophagy. *Biomed. Pharmacother.*
575 109, 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.037>
- 576

577 **Table 1.** Baseline Parameters of Dogs.
578

Parameter	Carvedilol	Placebo	p Value
	n = 6	n = 7	
Age (years)	8.3 ± 2.62	8.8 ± 3.40	NS
Female (%)	100	71	NS
Weight (Kg)	21.35 ± 13.48	17.26 ± 7.81	NS
Low-risk breeds (%)			
Mixed breed	1 (16.66)	3 (42.88)	
Brazilian terrier	1 (16.66)	1 (14.28)	
Poodle	1 (16.66)	0	
Pug	0	1 (14.28)	
High-risk breeds (%)			
Boxer	0	1 (14.28)	
Brazilian Dogo	1 (16.66)	0	
German Shepherd	1 (16.66)	0	
Belgian Shepherd (Malinois)	0	1 (14.28)	
Rottweiler	1 (16.66)	0	
B1 patients, n (%)	2 (33.33)	2 (28.57)	NS
Diastolic function (%)			
Normal	3 (50)	3 (42.86)	NS
Abnormal relaxation	3 (50)	4 (57.14)	
Baseline LVEF (%)	75.17 ± 3.34	77.43 ± 7.31	NS
LVDd (mm)	35.12 ± 7.89	33.33 ± 7.07	NS
LVSd (mm)	19.82 ± 3.94	18.29 ± 5.21	NS
LVIDDN	1.50 ± 0.07	1.45 ± 0.13	NS
Type of cancer, n (%)			
Mammary	2 (33.33)	2 (28.57)	NS
Lymphoma	2 (33.33)	2 (28.57)	NS
Sarcoma	2 (33.33)	2 (28.57)	NS
TVT	0	1 (14.29)	NS
CT strategy, n (%)			
CHOP 120mg/m ²	2 (33.33)	2 (28.57)	NS
DOX 120mg/m ²	0	2 (28.57)	NS
DOX 90mg/m ²	4 (66.67)	3 (42.86)	NS
Total doxorubicin dose (mg/m ²)	600	750	NS

579 p < 0.05 considered statistically significant. Data expressed as mean ± standard deviation or
580 percentage.

581 B1 patients = patients classified in stage B1 of Canine Chronic Valvular Heart Disease (ATKINS et
582 al., 2009); LVEF = left ventricular ejection fraction; LVDd = left ventricular diastolic diameter;
583 LVSd = left ventricular systolic diameter; LVIDDN = normalized left ventricular internal diameter
584 in diastole; TVT = transmissible venereal tumor; CT = chemotherapy; CHOP = cyclophosphamide,
585 doxorubicin, vincristine, prednisone; DOX = doxorubicin; NS = not significant.

586

587 **Table 2.** Results of Doppler Examination on Carvedilol and Placebo groups
 588

Parameter	Carvedilol group			Placebo group		
	Baseline	After CT	p Value	Baseline	After CT	p Value
Peak E velocity (m/s)	0.84 ± 0.11	0.73 ± 0.11	0.20	0.69 ± 0.13	0.76 ± 0.14	0.41
Peak A velocity (m/s)	0.74 ± 0.08	0.63 ± 0.21	0.35	0.72 ± 0.07	0.74 ± 0.12	0.76
E/A ratio	1.16 ± 0.23	1.30 ± 0.43	0.57	0.99 ± 0.32	1.07 ± 0.28	0.71
EDT (ms)	95.40 ± 16.64	80.20 ± 13.69	0.20	77.17 ± 8.41	100.7 ± 6.82	0.01*
IVRT (ms)	58.33 ± 7.65	60.50 ± 16.47	0.79	59.14 ± 6.62	54.71 ± 6.69	0.27
E/IVRT ratio	1.38 ± 0.27	1.08 ± 0.18	0.10	1.21 ± 0.35	1.38 ± 0.25	0.38
Peak E' velocity (m/s)	0.12 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.59	0.11 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.54
Peak A' velocity (m/s)	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.02	1.00	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.02	0.38
E'/A' ratio	1.28 ± 0.36	1.21 ± 0.45	0.82	0.97 ± 0.31	1.00 ± 0.33	0.87
E/E' ratio	6.30 ± 0.44	6.43 ± 0.53	0.75	6.21 ± 0.63	6.26 ± 0.95	0.93

589 *p < 0.05 considered statistically significant. Data expressed as mean ± standard deviation.

590 CT = chemotherapy; EDT = mitral flow deceleration time; IVRT = isovolumic relaxation time.

591

592 **Table 3.** Echocardiographic parameters on Carvedilol and Placebo groups
 593

Parameter	Carvedilol group			Placebo group		
	Baseline	After CT	p Value	Baseline	After CT	p Value
LVDd (mm)	35.12 ± 7.89	33.62 ± 7.48	0.76	33.33 ± 7.07	32.73 ± 5.63	0.87
LVSD (mm)	19.82 ± 3.94	18.60 ± 2.91	0.59	18.29 ± 5.21	17.90 ± 4.46	0.89
LVSF (%)	43.17 ± 3.29	43.17 ± 8.25	1.00	45.71 ± 7.32	45.86 ± 6.81	0.97
LVEF (%)	75.17 ± 3.34	75.00 ± 7.70	0.96	77.43 ± 7.31	77.71 ± 7.00	0.95
EPSS (cm)	0.28 ± 0.13	0.26 ± 0.10	0.77	0.33 ± 0.15	0.29 ± 0.08	0.54
LVIDDN	1.50 ± 0.07	1.46 ± 0.10	0.42	1.45 ± 0.13	1.45 ± 0.10	0.95
TAPSE (mm)	13.60 ± 2.35	13.12 ± 3.39	0.80	13.49 ± 3.77	13.11 ± 3.07	0.85
MAPSE (mm)	10.75 ± 2.44	9.98 ± 1.21	0.54	10.10 ± 2.44	10.79 ± 3.00	0.67
IVSd (mm)	9.47 ± 2.32	10.05 ± 3.27	0.75	8.67 ± 1.47	9.04 ± 1.64	0.69
LVPWd (mm)	9.08 ± 3.05	8.90 ± 3.10	0.93	8.43 ± 2.81	7.93 ± 1.57	0.71
IVSs (mm)	13.30 ± 2.92	13.80 ± 3.69	0.81	13.09 ± 2.75	13.43 ± 3.16	0.84
LVPWs (mm)	13.23 ± 3.96	13.25 ± 4.07	0.99	12.97 ± 3.18	12.53 ± 2.16	0.78
LA (cm)	2.07 ± 0.52	2.11 ± 0.42	0.90	2.15 ± 0.39	2.19 ± 0.33	0.87
Ao (cm)	1.79 ± 0.48	1.84 ± 0.47	0.88	1.82 ± 0.24	1.82 ± 0.29	0.97
LA/Ao	1.16 ± 0.07	1.17 ± 0.11	0.78	1.18 ± 0.10	1.20 ± 0.07	0.63
Aortic flow (m/s)	1.19 ± 0.11	1.16 ± 0.22	0.78	1.16 ± 0.23	1.12 ± 0.16	0.73
Pulmonar flow (m/s)	1.14 ± 0.24	0.92 ± 0.16	0.13	1.02 ± 0.12	0.98 ± 0.11	0.57

594 p < 0.05 considered statistically significant. Data expressed as mean ± standard deviation.
 595 CT = chemotherapy; LVDd = left ventricular diastolic diameter; LVSD = left ventricular systolic diameter;
 596 LVSF = left ventricular shortening fraction; LVEF = left ventricular ejection fraction; EPSS = mitral valve
 597 E point to septal separation; LVIDDN = normalized left ventricular internal diameter in diastole; TAPSE =
 598 tricuspid annular plane systolic excursion; MAPSE = mitral annular plane systolic excursion; IVSd =
 599 thickness of interventricular septum in diastole; LVPWD = thickness of left ventricular free wall in
 600 diastole; IVSs = thickness of interventricular septum in systole; LVPWs = thickness of left ventricular free
 601 wall in systole; LA = left atrium; Ao = aorta.

602

603

604 **Table 4.** Electrocardiographic parameters on Carvedilol and Placebo groups
 605

Parameter	Carvedilol group			Placebo group		
	Baseline	After CT	p Value	Baseline	After CT	p Value
Heart rate (bpm)	144.2 ± 46.9	108.8 ± 59.7	0.32	128.4 ± 10.6	123 ± 12.5	0.43
PR interval (s)	0.09 ± 0.02	0.10 ± 0.02	0.39	0.094 ± 0.01	0.094 ± 0.01	0.96
QRS complex (s)	0.058 ± 0.007	0.059 ± 0.004	0.89	0.060 ± 0.005	0.055 ± 0.005	0.08
QT interval (s)	0.19 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.12	0.19 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.03*
R wave amplitude (mV)	1.06 ± 0.36	1.10 ± 0.43	0.85	0.96 ± 0.26	1.00 ± 0.36	0.81
rV2 R amplitude (mV)	0.63 ± 0.11	0.65 ± 0.17	0.84	0.69 ± 0.28	0.72 ± 0.27	0.82
rV2 S amplitude (mV)	0.61 ± 0.21	0.63 ± 0.38	0.89	0.50 ± 0.34	0.62 ± 0.39	0.55
V2 R amplitude (mV)	0.99 ± 0.42	1.09 ± 0.46	0.71	0.88 ± 0.39	1.07 ± 0.45	0.46
V2 S amplitude (mV)	0.28 ± 0.07	0.27 ± 0.16	0.97	0.18 ± 0.16	0.18 ± 0.15	0.93
V4 R amplitude (mV)	1.01 ± 0.52	0.94 ± 0.45	0.82	0.76 ± 0.23	1.09 ± 0.46	0.14
V4 S amplitude (mV)	0.18 ± 0.12	0.15 ± 0.12	0.67	0.07 ± 0.09	0.07 ± 0.11	0.98
P wave duration (s)	0.048 ± 0.005	0.046 ± 0.005	0.60	0.046 ± 0.003	0.047 ± 0.005	0.73
P wave amplitude (mV)	0.20 ± 0.06	0.16 ± 0.07	0.42	0.22 ± 0.06	0.17 ± 0.06	0.17

606 * p < 0.05 considered statistically significant. Data expressed as mean ± standard deviation.
 607 CT = chemotherapy.
 608

609
610

611

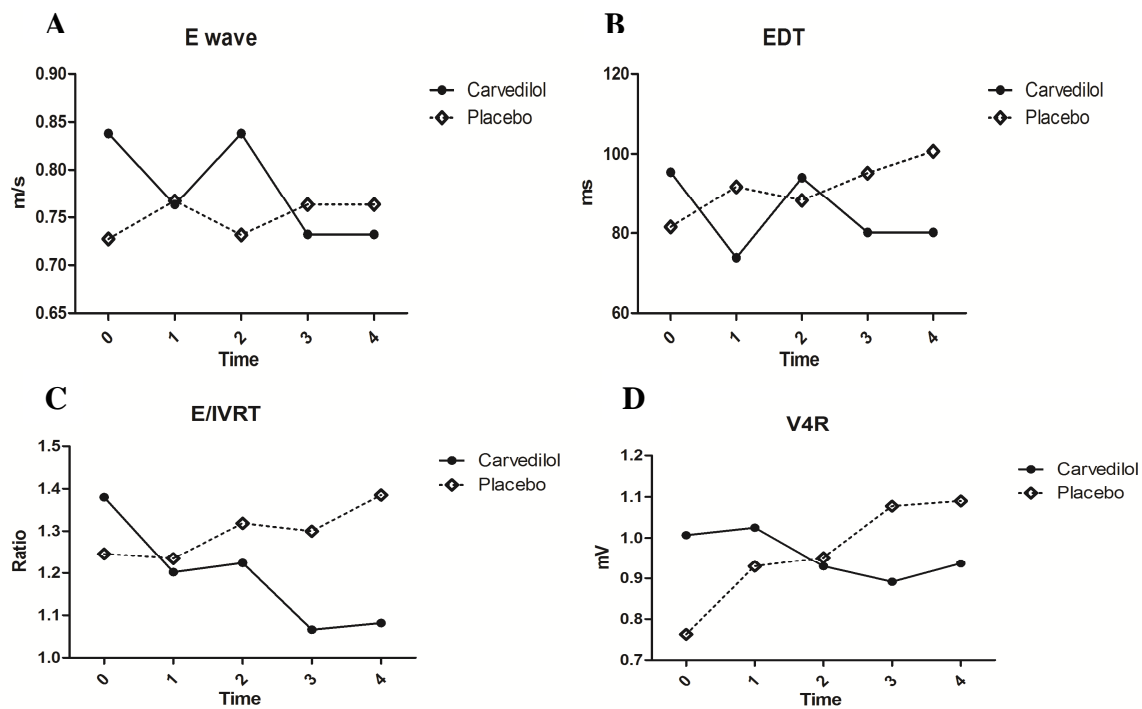
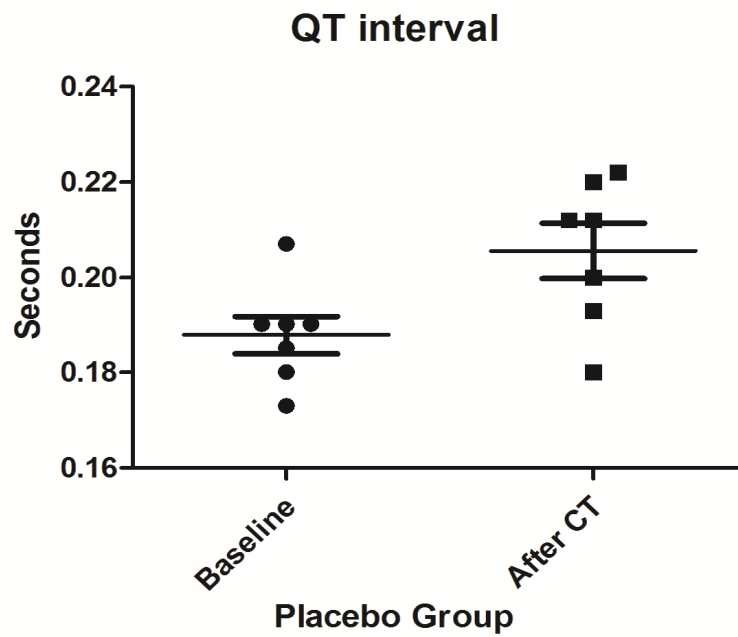
612
613
614
615
616

Figure 1. Variation of mean values obtained for E wave velocity (A), EDT (B), E/IVRT ratio (C) and R amplitude at V4 precordial chest lead (D) during cardiological evaluations in the two groups. $p < 0.05$. EDT = mitral flow deceleration time; IVRT = isovolumic relaxation time.

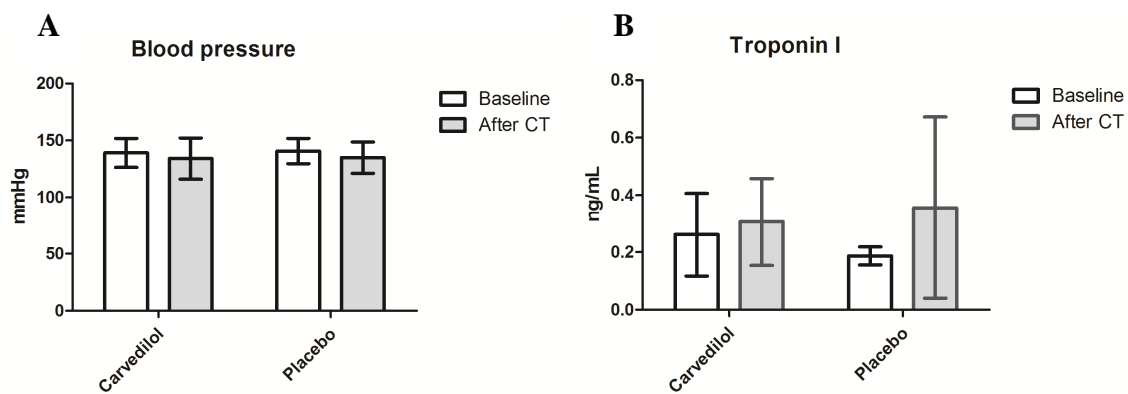
617
618



619
620
621
622

Figure 2. Variation of mean values obtained for QT interval before and after chemotherapy in placebo group. $p < 0.05$. CT = chemotherapy.

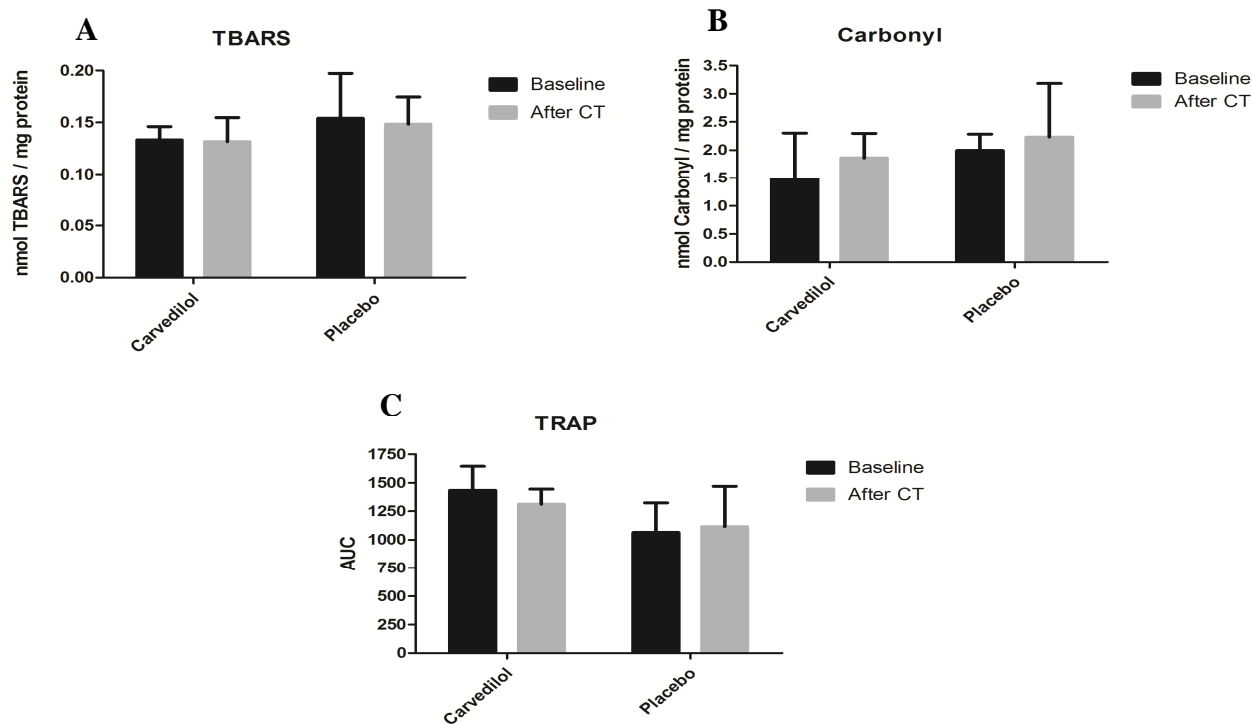
623
624



625
626
627
628
629

Figure 3. Variation of mean values obtained for blood pressure (A) and troponin I (B) before and after chemotherapy in the two groups. $p > 0.05$. CT = chemotherapy.

630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652



653 **Figure 4.** Variation of mean values obtained for TBARS (A), carbonyl (B) and TRAP (C) before
654 and after chemotherapy in the two groups. $p > 0.05$. CT = chemotherapy; TBARS = thiobarbituric
655 acid reactive substances; TRAP = total non-enzymatic antioxidant potential; AUC = area under the
656 curve.

CONCLUSÕES

Com este trabalho observamos que o grupo carvedilol não apresentou algumas alterações vistas no grupo placebo, tais como alteração nos padrões diastólicos ecocardiográficos (onda E, TDE e E/TRIV) e nos padrões eletrocardiográficos (intervalo QT e amplitude de onda R na pré-cordial V4/CV6LU). Dessarte, apesar de não termos encontrado resultados significativos na mortalidade, troponina I e testes bioquímicos de dano oxidativo, podemos sugerir que o carvedilol concedeu efeito cardioprotetor na função diastólica e em alguns parâmetros eletrocardiográficos.

O número pequeno de animais e possivelmente a dose e o início da administração do carvedilol são algumas das principais limitações do ensaio clínico. Somado a isso, não podemos deixar de citar a padronização da dose cumulativa da doxorubicina e da neoplasia em questão, além de um maior período de acompanhamento após o término da quimioterapia.

Em suma, mais estudos são necessários com o carvedilol como cardioprotetor em cães como pacientes oncológicos em tratamento com doxorubicina, visto que esta é utilizada rotineiramente na oncologia veterinária por seu poder remissional.

REFERÊNCIAS

ABUOSA, A. M.; ELSHIEKH, A. H.; QURESHI, K.; ABRAR, M. B.; KHOLEIF, M. A.; KINSARA, A. J.; ANDEJANI, A.; AHMED, A. H.; CLELAND, J. G. F. Prophylactic use of carvedilol to prevent ventricular dysfunction in patients with cancer treated with doxorubicin. **Indian Heart Journal**, v. 70, p. 96–100, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ihj.2018.06.011>>.

ADAMS III, J. E.; BODOR, G. S.; DÁVILLA-ROMÁN, V. G.; DELMEZ, J. A.; APPLE, F. S.; LADENSON, J. H.; JAFFE, A. S. Cardiac Troponin I. A marker with high specificity for cardiac injury. **Circulation**, v. 88, n. 1, p. 101–106, 1993.

ALRUSHAID, S.; ZHAO, Y.; SAYRE, C. L.; MAAYAH, Z. H.; FORREST, M. L.; SENADHEERA, S. N.; CHABOYER, K.; ANDERSON, H. D.; EL-KADI, A. O. S.; DAVIES, N. M. Mechanistically elucidating the in vitro safety and efficacy of a novel doxorubicin derivate. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 7, n. 4, p. 582–597, 2017.

AMMANN, P.; FEHR, T.; MINDER, E. I.; GUNTER, C.; BERTEL, O. Elevation of troponin I in sepsis and septic shock. **Intensive Care Medicine**, v. 27, n. 6, p. 965–969, 2001.

ARCAMONE, F.; CASSINELLI, G.; FANTINI, G.; GREIN, A.; OREZZI, P.; POL, C.; SPALLA, C. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 11, n. 6, p. 1101–1110, 1969.

ARICA, V.; DEMIR, I. H.; TUTANC, M.; BASARSLAN, F.; ARICA, S.; KARCOIGLU, M.; OZTURK, H.; NACAR, A. N-acetylcysteine prevents doxorubicine-induced cardiotoxicity in rats. **Human & Experimental Toxicology**, v. 32, p. 655–661, 2013.

ASANUMA, H.; MINAMINO, T.; SANADA, S.; TAKASHIMA, S.; OGITA, H.; OGAI, A.; ASAKURA, M.; LIAO, Y.; ASANO, Y.; SHINTANI, Y.; KIM, J.; SHINOZAKI, Y.; MORI, H.; NODE, K.; KITAMURA, S.; TOMOIKE, H.; HORI, M.; KITAKASE, M. β -adrenoceptor blocker carvedilol provides cardioprotection via an adenosine-dependent mechanism in ischemic canine hearts. **Circulation**, v. 109, p. 2773–2779, 2004.

ASSUMPÇÃO, J. U. C. V.; CAMPOS, M. L.; NOGUEIRA FILHO, M. A. F.; PESTANA, K. C.; BALDAN, H. M.; PILON, T. P. F.; OLIVEIRA, A. G.; PECCININI, R. G. Biocompatible Microemulsion Modifies the Pharmacokinetic Profile and Cardiotoxicity of Doxorubicin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 1, p. 289–296, 2013.

ATKINS, C.; BONAGURA, J.; ETTINGER, S.; FOX, P.; GORDON, S.; HAGGSTROM, J.; HAMLIN, R.; KEENE, B.; STEPIEN, R. Guidelines for the diagnosis and treatment of canine chronic valvular heart disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, p. 1142–1150, 2009.

BARISON, A.; PASTORMERLO, L. E.; GIANNONI, A. Troponin In Non-Ischaemic

Cardiomyopathy. **European Cardiology**, v. 7, n. 3, p. 220–224, 2011.

BERGMANN, O.; BHARDWAJ, R. D.; BERNARD, S.; ZDUNEK, S.; BARNABÉ-HEIDER, F.; WALSH, S.; ZUPICICH, J.; ALKASS, K.; BUCHHOLZ, B. A.; DRUID, H.; JOVINGE, S.; FRISÉN, J. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. **Science**, v. 324, n. 5923, p. 98–102, 2009.

BOTTARI, N. B.; MUNHOZ, T. D.; TORBITZ, V. D.; TONIN, A. A.; ANAI, L. A.; SEMOLIN, L. M. S.; JARK, P. C.; BOLLICK, Y. S.; MORESCO, R. N.; FRANÇA, R. T.; LOPES, S. T. A.; STEFANI, L. M.; SILVA, A. S. Da; LOPES, S. T. A.; STEFANI, L. M.; TINUCCI-COSTA, M.; SILVA, A. S. Da. Oxidative stress in dogs with multicentric lymphoma : Effect of chemotherapy on oxidative and antioxidant biomarkers. **Redox Report**, v. 20, n. 6, p. 267–274, 2015.

BUDNI, P.; PEDROSA, R. C.; GARLET, T. R.; DALMARCO, E. M.; DALMARCO, B.; ROSA, M.; LINO, D. O.; SIMIONATO, E. L.; AMARA, J. A.; SÍLVIA, T.; FILHO, D. W. Carvedilol atenua o estresse oxidativo na cardiopatia chagásica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 98, p. 218–224, 2012.

CANDIDO, C. D.; CAMPOS, M. L.; ASSUMPCÃO, J. U. C. V; PESTANA, K. C.; PADILHA, E. C.; CARLOS, I. Z.; PECCININI, R. G. Biocompatible Microemulsion Modifies the Tissue Distribution of Doxorubicin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, p. 3297–3301, 2014.

CARDINALE, D.; COLOMBO, A.; SANDRI, M. T.; LAMANTIA, G.; COLOMBO, N.; CIVELLI, M.; MARTINELLI, G.; VEGLIA, F.; FIORENTINI, C.; CIPOLLA, C. M. Prevention of high-dose chemotherapy-induced cardiotoxicity in high-risk patients by angiotensin-converting enzyme inhibition. **Circulation**, v. 114, n. 23, p. 2474–2481, 2006.

CHU, F. F.; ESWORTHY, R. S.; CHU, P. G.; LONGMATE, J. A.; HUYPHE, M. M.; WILCZYNSKI, S.; DOROSHOW, J. H. Bacteria-induced intestinal cancer in mice with disrupted Gpx1 and Gpx2 genes. **Cancer Research**, v. 64, p. 962–968, 2004.

CUMMINS, B.; AUCKLAND, M. L.; CUMMINS, P. Cardiac-specific troponin I radioimmunoassay in the diagnosis of acute myocardial infarction. **American Heart Journal**, v. 113, n. 6, p. 1333–1344, 1987.

DAGLI, M. L. Z.; LUCAS, S. R. R. Agentes antineoplásicos. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. (Ed.). **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária**. 4th. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 667–686.

DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B. **Oncologia em cães e gatos**. 2 ed ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016.

DINIZ, P. P. V. P.; DE MORAIS, H. S. A.; BREITSCHWERDT, E. B.; SCHWARTZ, D. S. Serum Cardiac Troponin I Concentration in Dogs with Ehrlichiosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, p. 1136–1143, 2008.

DOROSHOW, J. H. Effect of Anthracycline Antibiotics on Oxygen Radical Formation in Rat Heart. **Cancer Research**, v. 43, p. 460–472, 1983.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S.; MATSUBARA, B. B. Anthracycline-Induced Cardiotoxicity. **Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 278–281, 2008.

FITZPATRICK, W. M.; DERVISIS, N. G.; KITCHELL, B. E. Safety of concurrent administration of dexrazoxane and doxorubicin in the canine cancer patient. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 8, n. 4, p. 273–282, 2010.

FONFARA, S.; LOUREIRO, J.; SWIFT, S.; JAMES, R.; CRIPPS, P.; DUKES-MCEWAN, J. Cardiac troponin I as a marker for severity and prognosis of cardiac disease in dogs. **The Veterinary Journal**, v. 184, p. 334–339, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.04.004>>.

GALLAY-LEPOUTRE, J.; BÉLANGER, M. C.; NADEAU, M. E. Prospective evaluation of Doppler echocardiography, tissue Doppler imaging and biomarkers measurement for the detection of doxorubicin-induced cardiotoxicity in dogs: A pilot study. **Research in Veterinary Science**, v. 105, p. 153–159, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.02.001>>.

GILLINGS, S.; JOHNSON, J.; FULMER, A.; HAUCK, M. 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**, v. 10, p. 46–58, 2009.

GORDON, S. G.; ARSENAULT, W. G.; LONGNECKER, M.; BOOTHE, D. M.; MILLER, M. W.; CHALKLEY, J. Pharmacodynamics of Carvedilol in Conscious, Healthy Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, p. 297–304, 2006.

GOYAL, V.; BEWS, H.; CHEUNG, D.; PREMECZ, S.; MANDAL, S.; SHAIKH, B.; BEST, R.; BHINDI, R.; CHAUDHARY, R.; RAVANDI, A.; THLIVERIS, J.; SINGAL, P. K.; NIRLA, S.; JASSAL, D. S. The Cardioprotective Role of N-Acetyl Cysteine Amide in the Prevention of Doxorubicin and Trastuzumab Mediated Cardiac Dysfunction. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 32, n. 12, p. 1513–1519, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cjca.2016.06.002>>.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Inflammation**, v. 35, n. 5, p. 1147–1150, 2007a.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? **Biochemical Journal**, v. 401, p. 1–11, 2007b.

HALLMAN, B. E.; HAUCK, M. L.; WILLIAMS, L. E.; HESS, P. R.; SUTER, S. E. Incidence and risk factors associated with development of clinical cardiotoxicity in dogs receiving doxorubicin. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, p. 1–9, 2019.

HERMAN, E. H.; RAHMAN, A.; FERRANS, V. J.; VICK, J. A.; SCHEIN, P. S. Prevention of Chronic Doxorubicin Cardiotoxicity in Beagles by Liposomal Encapsulation. **Cancer Research**, v. 43, p. 5427–5432, 1983.

HORNE, W. A.; GILMORE, D. R.; DIETZE, A. E.; FREDEN, G. O.; SHORT, C. E. Effects of gastric distention-volvulus on coronary blood flow and myocardial oxygen

consumption in the dog. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, n. 1, p. 98–104, 1985.

IMONDI, A. R.; TORRE, P. D.; MAZUÉ, G.; SULLIVAN, T. M.; ROBBINS, T. L.; HAGERMAN, L. M.; PODESTA, A.; PINCIROLI, G. Dose-Response Cardiotoxicity Relationship of Dexrazoxane for Prevention of Doxorubicin-induced in Mice, Rats, and Dogs. **Cancer Research**, v. 56, p. 4200–4204, 1996.

ISHII, K.; ZHEN, L. X.; WANG, D. H.; FUNAMORI, Y.; OGAWA, K.; TAKEDA, K. Prevention of mammary tumorigenesis in acatalasemic mice by vitamin E supplementation. **Cancer Research**, v. 87, p. 680–684, 1996.

JAYASRI, K.; PADMAJA, K.; SAIBABA, M. Altered oxidative stress and carbohydrate metabolism in canine mammary tumors. **Veterinary World**, v. 9, n. 12, p. 1489–1492, 2016.

KALAY, N.; BASAR, E.; OZDOGRU, I.; ER, O.; CETINKAYA, Y.; DOGAN, A.; INANC, T.; OGUZHAN, A.; ERYOL, N. K.; TOPSAKAL, R.; ERGIN, A. Protective effects of carvedilol against anthracycline-induced cardiomyopathy. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 48, p. 2258–2262, 2006.

KANTER, P.; BULLARD, G.; GINSBERG, R.; PILKIEWCZ, F.; MAYER, L.; CULLIS, P.; PAVELIC, Z. Comparison of the cardiotoxic effects of liposomal doxorubicin (TLC D-99) versus free doxorubicin in beagle dogs. **In Vivo**, v. 7, p. 17–26, 1993.

KHEIRI, B.; ABDALLA, A.; OSMAN, M.; HAYKAL, T.; CHAHINE, A.; AHMED, S.; OSMAN, K.; HASSAN, M.; BACHUWA, G.; BHATT, D. L. Meta-analysis of Carvedilol for the Prevention of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity. **The American Journal of Cardiology**, v. 22, n. 11, p. 1959–1964, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2018.08.039>>.

KOCATURK, M.; MARTINEZ, S.; ERALP, O.; TVARIJONAVICIUTE, A.; CERON, J.; YILMAZ, Z. Tei index (myocardial performance index) and cardiac biomarkers in dogs with parvoviral enteritis. **Research in Veterinary Science**, v. 92, p. 24–29, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.10.018>>.

LANGHORN, R.; OYAMA, M. A.; KING, L. G.; MACHEN, M. C.; TRAFNY, D. J.; THAWLEY, V.; WILLESEN, J. L.; TARNOW, I.; KJELGAARD-HANSEN, M. Prognostic Importance of Myocardial Injury in Critically Ill Dogs with Systemic Inflammation. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, p. 895–903, 2013.

LANGHORN, R.; PERSSON, F.; GODDARD, A.; SCHOEMAN, J. P.; WILLESEN, J. L.; TARNOW, I.; KJELGAARD-HANSEN, M. Myocardial injury in dogs with snake envenomation and its relation to systemic inflammation. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 24, n. 2, p. 174–181, 2014.

LOBETTI, R.; DVIR, E.; PEARSON, J. Cardiac Troponins in Canine Babesiosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, p. 63–68, 2002.

MACHADO, V. S.; CRIVELLENTI, L. Z.; BOTTARI, N. B.; TONIN, A. A.; PELINSON, L. P.; BORIN-CRIVELLENTI, S.; SANTANA, A. E.; TORBITZ, V. D.;

- MORESCO, R. N.; DUARTE, T.; DUARTE, M. M. M. F.; SCHETINGER, M. R. C.; MORSCH, V. M.; JAQUES, J. A.; TINUCCI-COSTA, M.; SILVA, A. S. Da. Oxidative stress and inflammatory response biomarkers in dogs with mammary carcinoma. **Pathology -- Research and Practice**, v. 211, p. 677–681, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2015.06.011>>.
- MARCONDES-SANTOS, M.; TARASOUTCHI, F.; MANSUR, A. P.; STRUNZ, M. C. Effects of Carvedilol Treatment in Dogs with Chronic Mitral Valvular Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, p. 996–1001, 2007.
- MATSUI, H.; MORISHIMA, I.; NUMAGUCHI, Y.; TOKI, Y.; OKUMURA, K.; HAYAKAWA, T. Protective Effect of Carvedilol against Doxorubicin-induced Cardiomyopathy in Rats. **Life Sciences**, v. 65, n. 12, p. 1265–1274, 1999.
- MAULDIN, G. E.; FOX, P. R.; PATNAIK, A. K.; BOND, B. R.; MOONEY, S. C.; MATUS, R. E. Doxorubicin-Induced Cardiotoxicosis. Clinical Features in 32 Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 6, n. 2, p. 82–88, 1992.
- NEUWALD, E. B. **Avaliação hematológica, bioquímica e eletrocardiográfica de cães com diferentes neoplasias tratados com doxorubicina**. 2009. 93f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.
- O'BRIEN, P. J. Cardiac troponin is the most effective translational safety biomarker for myocardial injury in cardiotoxicity. **Toxicology**, v. 245, p. 206–218, 2008.
- O'BRIEN, P. J.; LANDT, Y.; LADENSON, J. H. Differential reactivity of cardiac and skeletal muscle from various species in a cardiac troponin I immunoassay. **Clinical Chemistry**, v. 43, n. 12, p. 2333–2338, 1997.
- O'BRIEN, P. J.; SMITH, D. E.; KNECHTEL, T. J.; MARCHAK, M. A.; PRUIMBOOM-BREES, I.; BREES, D. J.; SPRATT, D. P.; ARCHER, F. J.; BUTLER, P.; POTTER, A. N.; PROVOST, J. P.; RICHARD, J.; SNYDER, P. A.; REAGAN, W. J. Cardiac troponin I is a sensitive and specific biomarker of cardiac injury in laboratory. **Laboratory Animals**, v. 40, p. 153–171, 2006. Disponível em: <<Go to ISI>://A1997XD36300394>.
- OLIVEIRA, P. J.; BJORK, J. A.; SANTOS, M. S.; LEINO, R. L.; FROBERG, M. K.; MORENO, J.; WALLACE, K. B. Carvedilol-mediated antioxidant protection against doxorubicin-induced cardiac mitochondrial toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 200, p. 159–168, 2004.
- OYAMA, M. A.; SISSON, D. D. Cardiac Troponin-I Concentration in Dogs with Cardiac Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 18, p. 831–839, 2004.
- OYAMA, M. A.; SISSON, D. D.; PROS, R.; BULMER, B. J.; LUETHY, M. W.; FUENTES, V. L. Carvedilol in Dogs with Dilated Cardiomyopathy. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, p. 1272–1279, 2007.
- PALMIERI, B.; SBLENDORIO, V. Oxidative stress tests : overview on reliability and use. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 11, p. 309–342, 2007.
- PARK, M.; STEINBERG, S. F. Carvedilol Prevents Redox Inactivation of Cardiomyocyte

B1-Adrenergic Receptors. **JACC: Basic to Translational Science**, v. 3, n. 4, p. 521–532, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2018.06.002>>.

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

POLEGATO, B. F.; MINICUCCI, M. F.; AZEVEDO, P. S.; CARVALHO, R. F.; CHIUSO-MINICUCCI, F.; PEREIRA, E. J.; PAIVA, S. A. R.; ZORNOFF, L. A. M.; OKOSHI, M. P.; MATSUBARA, B. B.; MATSUBARA, L. S. Acute doxorubicin-induced cardiotoxicity is associated with matrix metalloproteinase-2 alterations in rats. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 5, p. 1924–1933, 2015.

RAHMAN, A.; KESSLER, A.; MORE, N.; SIKIC, B.; ROWDEN, G.; WOOLLEY, P.; SCHEIN, P. S. Liposomal Protection of Adriamycin-induced Cardiotoxicity in Mice. **Cancer Research**, v. 40, p. 1532–1537, 1980.

ROSA, F. A. **Avaliação dos efeitos do carvedilol, ciclosporina a e citrato de sildenafil sobre a cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina em modelo experimental com coelhos**. 2016. 109f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista, 2016.

RUFFOLO, R. R.; FEUERSTEIN, G. Z. Pharmacology of Carvedilol: Rationale for Use in Hypertension, Coronary Artery Disease, and Congestive Heart Failure. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 11, p. 247–256, 1997.

SANTOS, D. L.; MORENO, A. J. M.; LEINO, R. L.; FROBERG, M. K.; WALLACE, K. B.; PHAR-, K. B. T. A. Carvedilol Protects against Doxorubicin-Induced Mitochondrial Cardiomyopathy. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 185, p. 218–227, 2002.

SASSE, S.; BRAND, N. J.; KYPRIANOU, P.; DHOOT, G. K.; WADE, R.; ARAI, M.; PERIASAMY, M.; YACoub, M. H.; BARTON, P. J. R. Troponin I Gene Expression During Human Cardiac Development and in End-Stage Heart Failure. **Circulation Research**, v. 72, n. 5, p. 932–938, 1993.

SAWANGKOON, S. **Potential for carvedilol to modify doxorubicin cardiotoxicity**. 2002. 111f. Dissertação. The Ohio State University, 2002.

SAWANGKOON, S.; MIYAMOTO, M.; NAKAYAMA, T.; HAMLIN, R. L. Acute cardiovascular effects and pharmacokinetics of carvedilol in healthy. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, p. 57–60, 2000.

SCHAEFER, W. H.; POLITOWSKI, J.; HWANG, B.; DIXON, F.; GOALWIN, A.; GUTZAIT, L.; ANDERSON, K.; DEBROSSE, C.; BEAN, M.; RHODES, G. R. Metabolism of carvedilol in dogs, rats and mice. **Drug metabolism and disposition**, v. 26, n. 10, p. 958–969, 1998.

SCHOBBER, K. E.; CORNAND, C.; KIRBACH, B.; AUPPERLE, H.; OECHTERING, G. Serum cardiac troponin I and cardiac troponin T concentrations in dogs with gastric dilatation-volvulus. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 221, n. 3, p. 381–388, 2002.

- SCHOBER, K. E.; KIRBACH, B.; OECHTERING, G. Noninvasive assessment of myocardial cell injury in dogs with suspected cardiac contusion. **Journal of Veterinary Cardiology**, v. 1, n. 2, p. 17–25, 1999.
- SEGEV, G.; OHAD, D. G.; SHIPOV, A.; KASS, P. H.; AROCH, I. Cardiac Arrhythmias and Serum Cardiac Troponins in *Vipera palaestinae* Envenomation in Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, p. 106–113, 2008.
- SELTING, K. A.; LANA, S. E.; OGILVIE, G. K.; OLMSTEAD, A.; MYKLES, D. L.; BRIGHT, J.; RICHARDSON, K. L.; WALTON, J. A.; MONNET, E.; FETTMAN, M. J. 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**, v. 2, n. 3, p. 142–156, 2004.
- SILVA, C. E. V; CAMACHO, A. A. Alterações ecocardiográficas em cães sob tratamento prolongado com doxorubicina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 3, p. 300–306, 2005.
- SILVA, C. E. V; CAMACHO, A. A.; NAKAGE, A. P. M.; SANTANA, A. E.; CANOLA, J. C. Efeitos Cardiovasculares, Hematológicos e Bioquímicos do Tratamento Crônico Experimental com Doxorubicina em Cães. **Ars Veterinaria**, v. 20, n. 2, p. 185–194, 2004.
- SIMUNEK, T.; STERBA, M.; POPEVOLÁ, O.; ADAMCOVÁ, M.; HRDINA, R.; GERSL, V. Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. **Pharmacological Reports**, v. 61, p. 154–171, 2009.
- SKRZYPIEC-SPRING, M.; HACZKIEWICZ, K.; SAPA, A.; PIASECKI, T.; KWIATKOWSKA, J.; CEREMUGA, I.; WOZNIAK, M.; BICZYSKO, W.; KOBIERZYCKI, C.; DZIEGIEL, P.; PODHORSKA-OKOLOW, M.; SZELAG, A. Carvedilol Inhibits Matrix Metalloproteinase-2 Activation in Experimental Autoimmune Myocarditis : Possibilities of Cardioprotective Application. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**, v. 23, n. 1, p. 89–97, 2017.
- SLEEPER, M. M.; CLIFFORD, C. A.; LASTER, L. L. Cardiac Troponin I in the Normal Dog and Cat. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 15, p. 501–503, 2001.
- SOARES, E. C.; PEREIRA, G. G.; PETRUS, L. C.; NETO, M. L.; YAMAKI, F. L. Survival and echocardiographic evaluation of dogs with idiopathic dilated cardiomyopathy treated with carvedilol. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 555–563, 2010.
- SOUSA, M. G.; PAULINO-JUNIOR, D.; PASCON, J. P. E.; PEREIRA-NETO, G. B.; CARARETO, R.; CAMACHO, A. A. Assesment of the TEI index of myocardial performance in dogs with doxorubicin-induced cardiomiopathy. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 46, p. 63–68, 2014.
- SPALLAROSSA, P.; GARIBALDI, S.; ALTIERI, P.; FABBI, P.; MANCA, V.; NASTI, S.; ROSSETTIN, P.; GHIGLIOTTI, G.; BALLESTRERO, A.; PATRONE, F.; BARSOTTI, A.; BRUNELLI, C. Carvedilol prevents doxorubicin-induced free radical release and apoptosis in cardiomyocytes in vitro. **Journal of Molecular and Cellular**

Cardiology, v. 37, p. 837–846, 2004.

SPRATT, D. P.; MELLANBY, R. J.; DRURY, N.; ARCHER, J. Cardiac troponin I: evaluation of a biomarker for the diagnosis of heart disease in the dog. **Journal of Small Animal Practice**, v. 46, p. 139–145, 2005.

SURACHETPONG, S. D.; TEEWASUTRAKUL, P.; RUNGSIPIPAT, A. Serial measurements of cardiac troponin I (cTnI) in dogs treated with doxorubicin. **Japanese Journal of Veterinary Research**, v. 64, n. 4, p. 221–233, 2016.

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

SZCZUBIAL, M.; KANKOFER, M.; LOPUSZYNSKI, W.; DABROWSKI, R.; LIPKO, J. Oxidative Stress Parameters in Bitches with Mammary Gland Tumours. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 51, p. 336–340, 2004.

TAN, C.; ETCUBANAS, E.; WOLLNER, N.; ROSEN, G.; GILLADOCA, A.; SHOWEL, J.; MURPHY, M. L.; KRAKOFF, I. H. Adriamycin - an antitumor antibiotic in the treatment of neoplastic diseases. **Cancer**, v. 32, p. 9–17, 1973.

TEI, C. New non-invasive index for combined systolic and diastolic ventricular function. **Journal of Cardiology**, v. 26, p. 135–136, 1995.

VAJDOVICH, P.; KRISKA, T.; MEZES, M.; SZABO, P. R.; BALOGH, N.; BANFI, A.; ARANY-TOTH, A.; GAAL, T.; JAKUS, J. Redox status of dogs with non-hodgkin lymphomas. An ESR study. **Cancer Letters**, v. 224, p. 339–346, 2005.

VALKONEN, M.; KUUSI, T. Spectrophotometric assay for total peroxy radical- trapping antioxidant potential in human serum. **Journal of Lipid Research**, v. 38, p. 823–833, 1997.

VAN VLEET, J. F.; GREENWOOD, L.; FERRANS, V. J.; REBAR, A. H. Effect of selenium-vitamin E on adriamycin-induced cardiomyopathy in rabbits. **American Journal of Veterinary Research**, v. 39, p. 997–1010, 1978.

VEJPONGSA, P.; YEH, E. T. H. Prevention of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity: Challenges and Opportunities. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 64, n. 9, p. 938–945, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2014.06.1167>>.

WESS, G.; SIMAK, J.; MAHLING, M.; HARTMANN, K. Cardiac Troponin I in Doberman Pinschers with Cardiomyopathy. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, p. 843–849, 2010.

WINTER, J. L.; BARBER, L. G.; FREEMAN, L.; GRIESSMAYR, P. C.; MILBURY, P. E.; BLUMBERG, J. B. Antioxidant Status and Biomarkers of Oxidative Stress in Dogs with Lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, p. 311–316, 2009.

WORKING, P. K.; NEWMAN, M. S.; SULLIVAN, T.; YARRINGTON, J. Reduction of the Cardiotoxicity of Doxorubicin in Rabbits and Dogs by Encapsulation in Long-Circulating , Pegylated Liposomes. **The Journal of Pharmacology and Experimental**

Therapeutics, v. 289, n. 2, p. 1128–1133, 1999.

ZHANG, Q.-L.; YANG, J.-J.; ZHANG, H.-S. Carvedilol (CAR) combined with carnosic acid (CAA) attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity by suppressing excessive oxidative stress, inflammation, apoptosis and autophagy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 71–83, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.037>>.