

## Efeito do Enalaprilato na Cardiotoxicidade Induzida pela Doxorubicina

Joyce M. B. Santos, Bráulio Luna F<sup>o</sup>, Manuel J. Simões, Osvaldo A. Moura, Celso Ferreira, Eulógio E. Martinez F<sup>o</sup>, José A. Bocanegra

São Paulo, SP

**Objetivo** - Avaliar a ação do enalaprilato, inibidor da enzima de conversão da angiotensina, na prevenção da agressão miocárdica induzida pela doxorubicina.

**Métodos** - Foram constituídos e seguidos por sete semanas, quatro grupos de 10 ratos Wistar: controle (CONT); tratados com enalaprilato (ENA, 1mg/kg/d/sc); doxorubicina (DOX, 25mg/kg/d/sc) e doxorubicina simultâneo com enalaprilato (DOX+ENA). Em oito animais de cada grupo, o ventrículo esquerdo (VE) foi preparado para estudo morfométrico, utilizando-se corantes de hematoxilina-eosina e picro-sírius na identificação de fibras musculares e colágenas. Em cada grupo foram retirados três fragmentos de VE para exame com microscopia eletrônica. Para análise estatística, aplicou-se a prova de ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas quando houve diferença entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

**Resultados** - Microscopia de luz: não foi encontrada diferença significativa entre os quatro grupos estudados em relação à proporção de fibras colágenas e fibras musculares no miocárdio de rato; microscopia eletrônica: o índice de cristólise (relação entre o número de perfis de mitocôndrias que apresentava lesão e o número total de mitocôndrias contadas) mostrou diferença significativa entre os grupos DOX e DOX + ENA (30,1 vs 11,6,  $p \leq 0,01$ ).

**Conclusão** - O ENA preveniu as alterações tóxicas cardíacas induzidas pela DOX, minimizando as agressões ao nível mitocondrial e, se estes achados forem confirmados em anima nobilis, descortina-se uma possível nova indicação clínica para esse tipo de droga.

**Palavras-chaves:** doxorubicina, enalaprilato, miocardiopatia

### Effects of Enalaprilat on the Cardiotoxicity Induced by Doxorubicin

**Purpose** - To evaluate whether the enalaprilat, an angiotensin converting enzyme inhibitor, was able to prevent the myocardial damage induced by doxorubicin (DOX).

**Methods** - Four groups composed of 10 Wistar rats each were followed for seven weeks: control (CONT); treated with enalaprilat (ENA, 1mg/kg/d/sc); treated with doxorubicin (DOX, 25mg/kg/d/sc), and treated with doxorubicin plus enalaprilat (DOX+ENA). In eight animals of each group, the left ventricle (LV) was prepared for morphometric study and stained with HE and picro-sírius for identifying muscle fibers and collagen. In each group three fragments of the LV were examined with electronic microscopy (EM). For statistical analysis: the one-way analysis of variance was performed and was followed by multiple comparisons test when the difference between groups were detected  $p$  values  $\leq 0.05$  were considered significant.

**Results** - Light microscopy - it was not found any significant difference among the groups for muscle fibers patterns and proportion of collagen fibers of left ventricle. Electronic microscopy - the cristolysis index (proportion between normal and damage mitochondria) demonstrated significant difference between DOX and DOX+ENA groups (30.1 vs 11.6,  $p \leq 0.01$ ).

**Conclusion** - ENA prevented cardiotoxic alterations induced by DOX minimizing the aggression to the mitochondria and these findings, if confirmed in anima nobilis, may open a new clinical use for this type of drug.

**Key-words:** doxorubicin, enalaprilat, cardiomyopathy

Arq Bras Cardiol, volume 67 (nº4), 237-241, 1996

Desde o final da década de 60 até hoje, a doxorubicina (DOX) tem sido amplamente utilizada no tratamento de neoplasias<sup>1</sup>. Com o reconhecimento de sua potente atividade

de antineoplásica, observou-se que seus efeitos tóxicos são dose-dependentes e, também, demonstrou-se que pode existir uma dissociação entre as manifestações clínicas, às vezes exuberantes, e os achados de necropsias com pouca expressão histológica e, outras vezes, discretas manifestações clínicas, apresentando severas alterações miocárdicas<sup>2</sup>. Isto originou importante restrição clínica no tratamento de longo prazo pelo efeito tóxico cumulativo e, principalmente, potencial indutivo de cardiotoxicidade<sup>3</sup>.

Escola Paulista de Medicina - UNIFESP

Correspondência: Bráulio Luna F<sup>o</sup> - Rua Borges Lagoa, 1043/11 - 04038-032 - São Paulo, SP

Recebido para publicação em 27/11/95

Aceito em 26/6/96

A prevenção da miocardiopatia pela DOX tem sido objeto de numerosos estudos. Muitos esforços têm sido feitos para diminuir a toxicidade pela droga. Diferentes regimes de tratamento têm sido propostos e diversos agentes farmacológicos (digital<sup>4</sup>, anti-oxidantes<sup>5-8</sup>, betabloqueadores<sup>9,10</sup>, bloqueadores de canais de cálcio<sup>11</sup>, quelantes de ferro<sup>12</sup>) têm sido usados, concomitantemente, com a DOX na tentativa de diminuir o dano histomorfológico, porém, sem resultados satisfatórios.

Considerando-se que uma das mais importantes consequências do uso clínico da DOX é a falência cardíaca, provavelmente secundária ao acometimento direto do cardiomiócito, ou através de reações químicas que afetam a estrutura cardíaca, utilizamos, neste trabalho o enalaprilato (ENA), droga inibidora da enzima de conversão da angiotensina (ECA) I em angiotensina II, na prevenção dos efeitos cardiotoxícos da DOX, usando a análise morfométrica através de microscopia de luz, e eletrônica, como instrumento para identificar a presença de possível efeito protetor nos cardiomiócitos de ratos expostos ao uso concomitante da DOX e ENA.

## Métodos

Foram constituídos e seguidos por sete semanas, quatro grupos de 10 ratos Wistar-EPM: controle (CONT); tratados com enalaprilato (ENA, 1mg/kg/dia, subcutâneo); doxorubicina (DOX, 25mg/kg/dia, subcutâneo) e doxorubicina concomitante com enalaprilato (DOX+ENA). Em oito animais de cada grupo, o ventrículo esquerdo (VE) foi preparado para estudo morfométrico, utilizando-se corantes de hematoxilina-eosina e picro-sírius na identificação das fibras miocárdicas e colágenas. Para análise histométrica utilizou-se uma ocular Kpl-10x (Zeiss), com retículo de integração contendo 25 pontos dispostos simetricamente em cinco fileiras de cinco pontos, adaptadas à ocular do microscópio binocular Zeiss, com objetiva de 40x, totalizando um aumento final de 400x.

Em cada grupo, foram retirados três fragmentos de VE para exame com microscopia eletrônica. A integridade dos perfis mitocondriais foi analisada pela eletromicrografia. Identificou-se como lesão mitocondrial (cristólise) a presença de lise parcial ou total das suas cristas com substituição por áreas lacunares. O índice de cristólise (relação entre o número de perfis de mitocôndrias que apresentavam lesão e o número total de mitocôndrias contadas) foi realizado a partir de eletromicrografias dos animais estudados.

Para a análise estatística, aplicou-se a prova de ANOVA por um critério, seguida do teste de comparações múltiplas quando houve diferença entre os grupos estudados. Fixou-se em 0,05 ou 5% o nível para rejeição da hipótese de nulidade, assinalando-se com um asterisco os valores significantes.

## Resultados

Microscopia de luz - não encontramos diferença significativa entre os quatro grupos estudados em relação à

proporção de fibras colágenas e fibras musculares no miocárdio de rato. Não houve evidência histológica de edema, infiltrado ou necrose celular, nem qualquer outra alteração que se pudesse valorizar como expressão de agressão tóxica no miocárdio. Particularmente em relação às fibras colágenas, também não se observou nenhuma anormalidade (tab. I).

Microscopia eletrônica - houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos DOX e DOX+ENA em relação à proporção entre o número de perfis de mitocôndrias que apresentavam lesão versus o número total de mitocôndrias contadas - índice de cristólise. O grupo DOX apresentou o índice de cristólise cerca de 2,6 maior que o grupo DOX+ENA ( $p \leq 0,01$ ). Também se observou desorganização fibrilar importante nos sarcômeros dos cardiomiócitos no grupo da DOX (tab. I, gráfico I, fig. 1 a 4).

## Discussão

Desenvolvimento de miocardiopatia e falência cardíaca congestiva após a administração de DOX tem sido mostrado em seres humanos<sup>13</sup> e em vários animais<sup>14</sup>. No presente estudo, o desenvolvimento da miocardiopatia induzida pela DOX foi identificada histologicamente pela microscopia de luz e eletrônica. Esta droga induz cardiotoxicidade em ratos, modelo animal considerado ideal nos testes de toxicidade induzida pela DOX<sup>15</sup>.

A disfunção miocárdica induzida pela DOX parece

**Tabela I - Resultados da análise morfométrica do ventrículo esquerdo pela microscopia óptica e dos perfis mitocondriais pela microscopia eletrônica. (valores médios).**

|                                    | Controle | Enalaprilato (ENA) | Doxorubicina (DOX) | DOX+ENA |
|------------------------------------|----------|--------------------|--------------------|---------|
| Fibras colágenas                   | 2,1      | 2,8                | 2,5                | 1,8     |
| Fibras miocárdicas                 | 86,4     | 88,6               | 89,2               | 92,1    |
| Índice cristólise das mitocôndrias | 4,8      | 6,0                | 30,1*              | 11,6    |

\*  $p \leq 0,01$ .

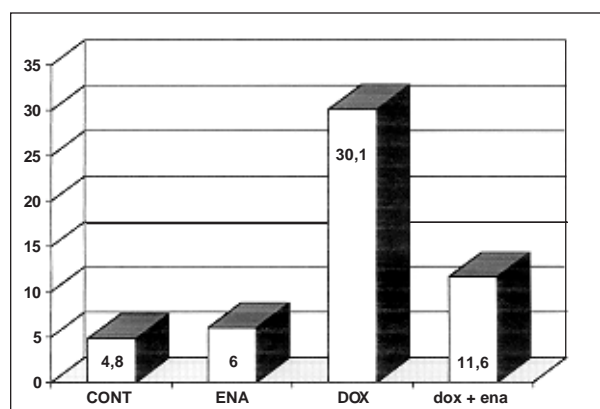


Gráfico I - Cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina - microscopia eletrônica. Índice de cristólise mitocondrial nos grupos estudados

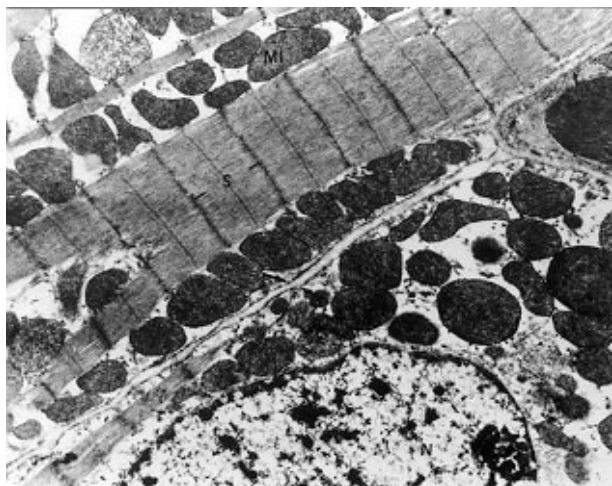


Fig. 1 - Eletromicrografia de parte de coração de rato pertencente ao grupo controle mostrando sarcômeros bem definidos (S). Notar a relação entre duas fibras musculares separadas por um espaço eletrotranslucente - sarcolema (setas). O citoplasma apresenta-se com grande concentração de mitocôndrias íntegras (MI). O núcleo (N) mostra eucromatina abundante e heterocromatina concentrada na periferia. 18.800 x.

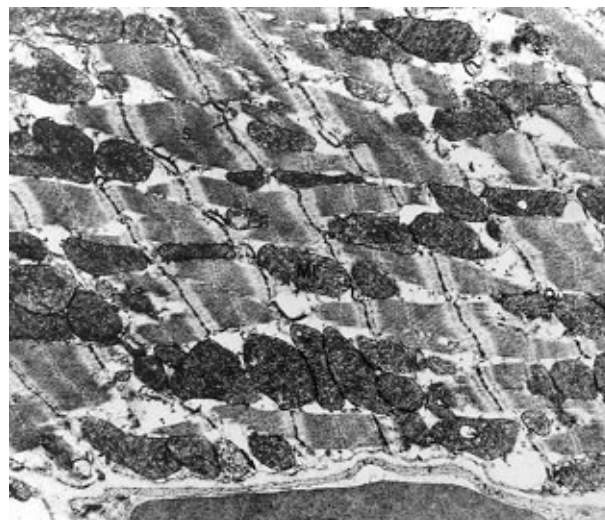


Fig. 2 - Eletromicrografia de parte de coração de rato pertencente ao grupo enalaprilato mostrando sarcômeros bem definidos (S). O citoplasma apresenta-se com grande concentração de mitocôndrias íntegras (MI). O núcleo (N) mostra eucromatina abundante e heterocromatina concentrada na periferia. 18.800 x.

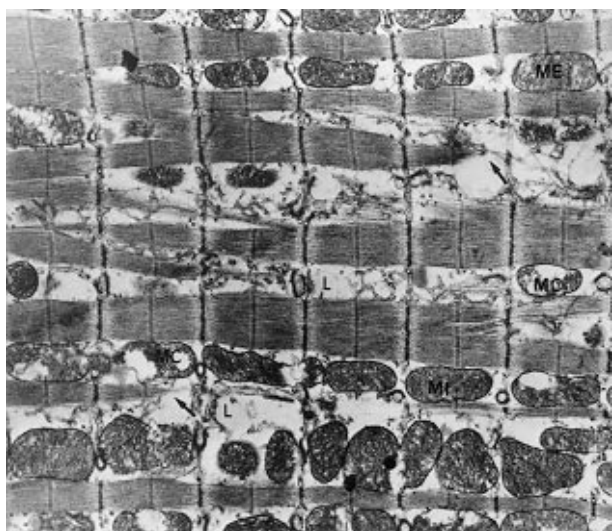


Fig. 3 - Eletromicrografia de parte de coração de rato pertencente ao grupo doxorubicina mostrando desorganização de miofibrilas com áreas de interrupção (setas) e mitocôndrias íntegras (MI), edemaciadas (ME) e com aspecto de cristólise (MC). Nos espaços intermiofibrilares observamos a presença de lacunas (L). 18.800 x.

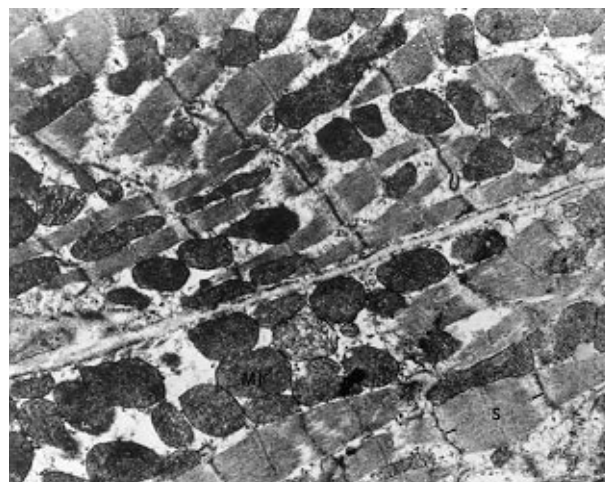


Fig. 4 - Eletromicrografia de parte de coração de rato pertencente ao grupo doxorubicina + enalaprilato mostrando sarcômeros bem definidos (S), com discreta desorganização. Observar citoplasma com grande concentração de mitocôndrias íntegras (MI). 18.800 x.

ser multifatorial<sup>16-19</sup>. Há evidências sugerindo inibição do ácido nucléico e síntese protéica<sup>16</sup>, liberação de aminas vasoativas<sup>17,18</sup>, anormalidades mitocondriais<sup>19</sup>, distúrbios no transporte de cálcio<sup>20</sup>, desequilíbrio eletrolítico<sup>21</sup>, formação de radicais livres<sup>22</sup> e peroxidação lipídica<sup>23</sup>.

Baseados no conhecimento do efeito cardiotoxíco da DOX e seu amplo espectro de ação em doenças neoplásicas, diversos estudos têm sido realizados tentando prevenir esse tipo de miocardiopatia. Com este objetivo, várias drogas como os betabloqueadores<sup>9,10</sup>, antagonista dos canais lentos do cálcio<sup>11</sup>, digital<sup>4</sup>, quelantes de ferro<sup>12</sup> e antioxidantes<sup>5-8</sup> têm sido utilizados com o intuito de prevenir as agressões cardíacas. Resultados insatisfatórios desses estudos estimularam-nos a usar o ENA, droga inibidora da ECA I, como provável cardioprotetor nessa situação fisiopatológica.

Embora esta droga não tenha sido testada especificamente neste modelo de indução de miocardiopatia pela DOX, conhecimentos originários de outros ensaios experimentais e clínicos descrevem uma ação tecidual importante com esse tipo de droga<sup>24</sup>. Os inibidores da ECA têm sido utilizados desde a década de 70 em pacientes com falência cardíaca, representando a única classe de agentes farmacológicos que têm reduzido a mortalidade<sup>25</sup> na insuficiência cardíaca.

Nosso estudo demonstrou que o tratamento simultâneo com ENA minimiza a miocardiopatia induzida pela DOX. Isto ficou bem evidenciado pela redução das alterações morfológicas ao nível da microscopia eletrônica. O grupo que recebeu concomitantemente DOX e ENA apresentou uma redução importante do índice de cristólise

(DOX: 30,1; DOX+ENA: 11,6,  $p \leq 0,01$ ).

O efeito de proteção miocárdica do ENA parece se relacionar com vários mecanismos. Atualmente, enfatiza-se à existência do sistema renina-angiotensina (SRA) tecidual no coração<sup>24</sup>. Trabalhos prévios sugerem que angiotensina II, sintetizada localmente no VE, pode influenciar o estado inotrópico do coração, facilitando a liberação de noradrenalina das terminações nervosas simpáticas cardíacas<sup>26</sup>, além de interferir no metabolismo cardíaco e crescimento celular<sup>27</sup>. Alternativamente, os inibidores da ECA podem interferir com os efeitos diretos da angiotensina na composição protéica miocárdica<sup>28</sup>. Em alguns experimentos<sup>29</sup>, o captopril mostrou-se eficaz como cardioprotetor após injúria e também pós-infarto do miocárdio. Já o enalapril teve efeito variável<sup>30</sup>. Isto foi interpretado como se a presença do grupo sulfidrila no captopril acrescentasse algum efeito benéfico adicional a esta droga<sup>29</sup>. Entretanto, o ramipril, também inibidor da ECA, mas sem o radical sulfidrila, mostrou-se efetivo como agente cardioprotetor experimental<sup>31</sup>.

Embora o efeito antioxidante dos inibidores da ECA seja importante, certamente este não é o mecanismo exclusivo pelo qual os inibidores da ECA são efetivos. Os inibidores da ECA diminuem a fibrose e a hipertrofia miocárdica<sup>32,33</sup> pela inibição do SRA aldosterona. Além disso, via inibição dos fibroblastos, interferem na remodelagem do tecido conectivo e do colágeno, prevenindo exagero de fibrose<sup>27</sup>. Apresenta também outros efeitos relaci-

onados com um aumento da biodisponibilidade da bradicinina. A bradicinina, além de efeito inotrópico<sup>34</sup> e cronotrópicos positivos<sup>35</sup>, aumenta o fluxo coronário e a concentração local de prostaglandina no coração.

No presente estudo, em modelo experimental de indução da forma crônica de miocardiopatia pela DOX, observamos ao nível ultra-estrutural proteção parcial dos cardiomiócitos de ratos que receberam, simultaneamente, DOX e ENA por sete semanas. Esta proteção parcial poderá estar relacionada com diversos fatores, dentre eles dose inadequada de ENA utilizada, ou a produção aumentada de angiotensina II como resposta a um agente agressor miocárdico envolvendo outras enzimas que não a ECA. Portanto, acreditamos que além da ativação do SRA, uma variedade de fatores é responsável pela deterioração cardíaca pela DOX. Como os mecanismos dos danos cardíacos e o método para preveni-los não são ainda conhecidos, estudos futuros serão necessários para elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na gênese das lesões patológicas induzidas pela DOX. Acreditamos que o ENA possa ter um papel nesta marcha do conhecimento, mas somente estudos clínicos no futuro poderão responder esta questão.

## Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro da CAPES.

## Referências

- Blum RM, Carter S - Adriamycin a new anticancer drug with significant clinical activity. *Ann Int Med* 1974; 80: 249-59.
- Isner JM, Ferrans VJ, Cohen SR et al - Clinical and morphological cardiac findings after anthracycline chemotherapy. Analysis of 64 patients studied at necropsy. *Am J Cardiol* 1983; 51: 1167-71.
- Fu LX, Waagstein F, Hjalmarson A - A new insight into adriamycin-induced cardiotoxicity. *Int J Cardiol* 1990; 29: 15-20.
- Guthrie D, Gibson AL - Doxorubicin cardiotoxicity: Possible role of digoxin in its prevention. *Br Med J* 1977; 2: 1447-9.
- Myers CE, Mc Guire W, Young R - Adriamycin: Amelioration of toxicity by alpha-tocopherol. *Cancer Treat Rep* 1976; 60: 961-2.
- Tesoriere L et al - Effect of vitamin A administration on resistance of rat heart against doxorubicin-induced cardiotoxicity and lethality. *J Pharmacol Exp Therap* 1993; 269: 430-5.
- Shimpo K et al - Ascorbic acid and adrimycin toxicity. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 12985-13015.
- Siveski-Iliskovic N, Hill M, Chow DA, Singal PK - Probucol protects against adriamycin cardiomyopathy without interfering with its antitumor effect. *Circulation* 1995; 91: 10-15.
- Choe JY, Combs AB, Folkers K - Potentiation of the toxicity of adriamycin by propranolol. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1978; 21: 577-80.
- Herman EH, Mhatre RM, Lee IP, Waravdekar VS - Prevention of the cardiotoxic effects of adriamycin and daunomycin in the isolated dog heart. *Proc Soc Exp Biol Med* 1972; 140: 234-9.
- Young DM, Mettler FP, Fioravanti JL - Adrimycin, verapamil and calcium metabolism. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1976; 18: 90.
- Herman E, Ferrans VJ - Reduction of chronic doxorubicin cardiotoxicity in dogs by pretreatment with 1,2-bis (3,5-dioxypiprazinyl-1-yl)propane (ICRF 187). *Cancer Res* 1981; 41: 3436-40.
- Lefrak EA, Pitha J, Rosenheim S, Gottlieb T - A clinicopathologic analysis of adrimycin cardiotoxicity. *Cancer* 1973; 32: 302-14.
- Czarnecki A, Hinek A, Soltysiak-Pawluczuk D - Adriamycin - induced cardiomyopathy, a rat model. *Pol J Pharmacol Pharm* 1986; 38: 171-7.
- Mettler FP, Young DM, Ward JM - Adriamycin - induced cardiotoxicity (cardiomyopathy and congestive heart failure) in rats. *Cancer Res* 1977; 37: 2705-14.
- Arena E, Biondo F, D' Alessandro N, Dusancher L, Gebbia N, Gerbasio R - DNA, RNA and protein synthesis in heart, liver and brain of mice treated with daunorubicin or adriamycin. *Int Res Commun Syst Med Sci* 1974; 2: 1053-61.
- Bristow et al - Acute and chronic cardiovascular effects of doxorubicin in the dog: the cardiovascular pharmacology of drug-induced histamine release. *Cardiovasc Pharmacol* 1980; 2: 487-515.
- Tong J, Ganguly PK, Singal PK - Myocardial adrenergic changes at two stages of heart failure due to adriamycin treatment in rats. *Am J Physiol* 1991; 1260: H909-H16.
- Gosalvez M, Van Rossum GDV, Blanco MF - Inhibition of sodium - potassium activated adenosine S - triphosphatase and non transport by adriamycin. *Cancer Res* 1979; 39: 257-61.
- Singal PK, Pierce GN - Adriamycin stimulates low-affinity  $Ca^{2+}$  binding and lipid peroxidation but depresses myocardial function. *Am J Physiol* 1986; 250: H419-H25.
- Olson HM, Young DM, Prieur DJ, Le Roy AF, Reagan RL - Electrolyte and morphologic alterations of myocardium in adriamycin treated rabbits. *Am J Pathol* 1974; 77: 439-54.
- Doroshov JH - Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. *Cancer Res* 1983; 43: 460-72.
- Myers CE, Mc Guire WP, Liss RH, Ifrim I, Grotzinger K, Young RC - Adriamycin: the role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. *Science* 1977; 19: 165-7.
- Dzau VJ - Implications of local angiotensin production in cardiovascular physiology and pharmacology. *Am J Cardiol* 1987; 59: 59A- 65A.
- Consensus Trial Study Group - Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure: results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (Consensus). *N Engl J Med* 1987; 316: 1429-35.
- Koch-Weser J - Myocardial actions of angiotensin. *Circ Res* 1964; 14: 337-44.
- Shelling P, Gantew D, Speck G, Fischer H - Effects of angiotensin II and angiotensin II antagonist saralasin on cell growth and renin in 3T3 and SV3T3 cells. *J Cell Physiol* 1979; 98: 503-13.
- Drexler H, Lindpaintner K, Lu W, Schieffer B, Ganten D - Transient increase in the

- expression of cardiac angiotensin - ogen in a rat model of myocardial infarction and failure. *Circulation* 1989; 80: II-459.
29. Westlin W, Mullane K - Does captopril attenuate reperfusion-induced myocardial dysfunction by scavenging free radicals? *Circulation* 1987; 77(suppl I): I30- I39.
  30. Przyklenk K, Kloner RA - Acute effects of hydralazine and enalapril on contractile function of postischemic "stunned" myocardium. *Am J Cardiol* 1987; 60: 934-6.
  31. Linz W, Schoelkens BA, Yi-Fan Han - Beneficial effects of the converting enzyme inhibition ramipril in ischemia hearts. *J Hypertens* 1986; 8(suppl 10): S91-S99.
  32. Rossi MA, Peres LC - Effect of captopril on the prevention and regression of myocardial cell hypertrophy and interstitial fibrosis in pressure overload cardiac hypertrophy. *Am Heart J* 1992; 124: 700-9.
  33. Costa EAS - Proteção miocárdica pelo enalaprilato na hipertrofia ventricular esquerda de ratos induzida pelo isoproterenol (Tese Mestrado). São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, 1994: 65 p.
  34. Rosas R, Montagne D, Gross M, Bohr DF - Cardiac action of vasoactive polypeptides in the rat: I bradykinin, II angiotensin. *Circ Res* 1965; 16: 150-61.
  35. Nakashima A, Angus JA, Johnston CI - Chronotropic effects of angiotensin I, angiotensin II, bradykinin, and norepinephrine in guinea pig atria. *Eur J Pharmacol* 1982; 81: 479-85.
-