

Avaliação de parâmetros eletrocardiográficos antes e após administração de um novo protótipo a fármaco cardiotônico (LASSBio294) em cães

Patrícia Nunes de Oliveira¹, Andréa Cintra Bastos Torres², Moisés Caetano e Souza³, Priscilla Regina Nasciutti⁴, Renata Carolina de Oliveira Lopes Brasil⁵, Rosângela de Oliveira Alves Carvalho⁶

Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO 74001-970, Brasil

E-mail: pat_pno@hotmail.com ; rosangela2210@gmail.com

Palavras-chave: eletrocardiograma, cardiologia, cão

1- INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca é hoje reconhecida como um problema importante e crescente de saúde pública. Estima-se que 6,4 milhões de brasileiros sofram de insuficiência cardíaca (ROSSI NETO, 2004). A prevalência das cardiopatias nos pequenos animais também está crescendo, principalmente porque a expectativa de vida dos animais de companhia aumenta a cada ano (SOARES & LARSSON, 2003). Em cães as cardiopatias representam em torno de 11% das enfermidades que os acometem (BUCHANAN, 1999). A insuficiência cardíaca é uma síndrome clínica complexa, que pode resultar de qualquer doença cardíaca ou metabólica

¹ Orientando PIBIC

² Doutoranda do Curso de Pós-graduação em Ciência Animal

³ Aluno de Graduação em Medicina Veterinária - PIVIC

⁴ Aluna de Graduação em Medicina Veterinária - PIBIC

⁵ Aluna de Graduação em Medicina Veterinária - PIVIC

⁶ Orientador

Revisado pelo Orientador

crônica, que prejudica a habilidade dos ventrículos em ejetar sangue. Os eventos compensatórios inicialmente preservam o débito cardíaco e a pressão sanguínea e posteriormente levam a deterioração progressiva da função do miocárdio (ROTH, 1993; SCHLESINGER E RUBIN, 1994; CARELOCK E CLARK, 2001).

A terapia geralmente empregada para o tratamento dos sinais de insuficiência cardíaca inclui o uso de fármacos com efeitos inotrópicos positivos, como glicosídeos cardíacos, combinados com diuréticos. Infelizmente o uso dos glicosídeos cardiotônicos tem sido restrito, em função de seus efeitos pró-arritmogênicos e do reduzido índice terapêutico que possuem (BARREIRO, 2002). Recentemente um novo protótipo a fármaco (LASSBio 294) capaz de promover efeitos vasodilatadores e inotrópicos positivos combinados, foi desenvolvido. O protótipo é um derivado *N*-acilidrazônico (NAH) e foi elaborado à partir do substrato de safrol, um composto extraído do óleo de sassafrás, encontrado em plantas como a *Ocotea pretiosa* (canela-branca) e *Piper hispidinervum* (BARREIRO et al., 2002; LIMA et al., 2000; SUDO et al., 2001).

O protótipo é ativo por via oral, e tem como vantagem efeitos vasodilatadores e inotrópicos positivos, aliados à ausência de toxicidade aguda (BARREIRO, 2002; KÜMMERLE, 2006). Sua atuação acontece por meio da regulação do íon cálcio (Ca^{+2}) em fibras cardíacas desnudas (BARREIRO, 2002), diferentemente dos mecanismos apresentados pelos glicosídeos cardíacos e β -adrenérgicos. O efeito inotrópico positivo do LASSBio 294 foi comprovado a partir de estimulação elétrica de tecido cardíaco de ratos, sendo observado um significativo incremento na contração desses tecidos após a perfusão com o composto sem causar alterações de condução e nem arritmias (SUDO et al., 2001).

No presente estudo foram feitos os testes *in vivo*, com o objetivo de determinar os efeitos do fármaco sobre o sistema cardiovascular. Para isso foi necessária a administração de doses pré-estabelecidas, obedecendo ao perfil toxicológico do fármaco e monitoração dos animais, por meio de exames eletrocardiográficos, como realizado em outros estudos de fármacos com mesmos efeitos cardiotônicos (KITZEN & WINBURY, 1989). Os cães da raça Beagle são amplamente utilizados em estudos toxicológicos. Recentemente têm se tornado um modelo importante para estudos de segurança farmacológica cardiovascular (KINTER et al., 2004; HAMMOND et al., 2001).

O eletrocardiograma (ECG) fornece informações sobre a frequência cardíaca, o ritmo cardíaco e a condução elétrica intracardíaca. Além disso, pode sugerir aumento das distintas câmaras cardíacas e alterações eletrolíticas. A eletrocardiografia (ECG) é o mais importante método de diagnóstico das arritmias cardíacas, podendo determinar a origem do ritmo e a frequência de despolarização do coração, fornecendo informações do estado clínico do miocárdio, uma vez que as deflexões P-QRS-T do traçado podem ser alteradas por uma patologia ou fator fisiológico, além de auxiliar no direcionamento terapêutico. As arritmias são comuns em cães, produzindo sinais clínicos como fadiga, intolerância ao exercício, perda de peso e, em casos mais severos, podem causar ataxia, colapso, coma e morte súbita (EDWARDS, 1987; ETTINGER, 1997; WOLF et al., 2000). O eletrocardiograma é um dos mais precoces e sensíveis indicadores do comprometimento do miocárdio (CZINER & LEVIN 1993, PACIORETTY et al. 1994). A ECG computadorizada possibilita sua utilização em serviços eletrocardiográficos de emergência, apresentando reprodutibilidade de medidas, progresso em controle de qualidade, diminuição no tempo requerido para exame e capacidade para manejar grandes volumes de ECGs em menor tempo. Em cães, as arritmias de maior incidência são os complexos ventriculares prematuros, complexos atriais prematuros, fibrilação atrial, bloqueios atrioventriculares de primeiro e segundo grau (TILLEY, 1995).

As avaliações eletrocardiográficas têm o intuito de demonstrar a segurança do fármaco diante das ações por ele propostas, como o impedimento da ocorrência de arritmias. Diante do exposto, tornou-se importante a realização do projeto, pois permitirá continuar o desenvolvimento de um novo medicamento, que poderá melhorar as condições clínicas e aumentar a sobrevida tanto de pequenos animais como de pessoas que possuem insuficiência cardíaca, uma vez que o cão é um modelo experimental para o estudo desta enfermidade em humanos. Respeitando os protocolos de pesquisa da RESOLUÇÃO N° 251 de Agosto de 1997 do Conselho Nacional de Saúde que determina realizar testes toxicológicos em três espécies animais distintas, sendo uma delas mamíferos não roedores, além de estudos acerca da farmacocinética do novo fármaco. Estes estudos realizados para avaliar a segurança de fármacos também são destinados a identificar e caracterizar efeitos farmacológicos secundários não desejados de medicamentos em animais que possam ser extrapolados para seres humanos.

2- OBJETIVOS

Avaliar os efeitos do LASSBio294 sobre o ritmo cardíaco de cães por meio da eletrocardiografia computadorizada antes e após a administração do fármaco cardiotônico, em três concentrações diferentes.

3- METODOLOGIA

Para a realização do estudo experimental foi utilizado o laboratório de Cardiologia do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás. O experimento foi realizado com cinco cadelas, adultas, da raça Beagle, consideradas clinicamente saudáveis, após exames clínicos e laboratoriais. Os animais foram alimentados com ração comercial⁷, com fornecimento de água à vontade, alojados em canis individuais.

Na primeira fase de experimentação todos os cães receberam uma dose de 2mg/kg de LASSbio 294, por via oral. Os animais foram submetidos ao exame eletrocardiográfico antes da administração do fármaco e após trinta, sessenta e noventa minutos, duas, quatro, seis, doze e vinte e quatro horas após a administração do mesmo. Na segunda e terceira fases de experimentação todas as cadelas receberam uma dose de 5mg/kg e 10mg/kg respectivamente, de LASSBio 294, por via oral, sendo submetidas às mesmas avaliações que foram realizadas na primeira fase. O intervalo entre as fases foi de sete dias.

Para a obtenção do eletrocardiograma (ECG), foi utilizado aparelho computadorizado - Tecnologia Eletrônica Brasileira –TEB (Figura 1). Com os animais contidos em decúbito lateral direito, em cada membro locomotor foi acoplado um eletrodo com a cor pré-determinada pela técnica descrita por TILLEY (1995) (Figura 2).

⁷ Ração Guabi Natural Cães Adultos

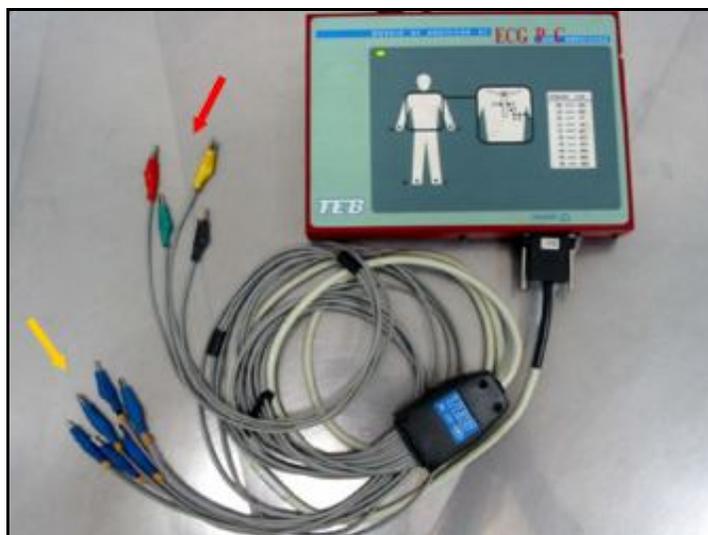


FIGURA 1. Eletrocardiógrafo computadorizado (ECGPC - TEB). Eletrodos para registro das derivações bipolares e unipolares amplificadas (**Seta vermelha**) e eletrodos para registro das derivações pré-cordiais (**Seta amarela**). Fonte: Serviço de Cardiologia, HV – UFG, Goiânia, GO (2007).

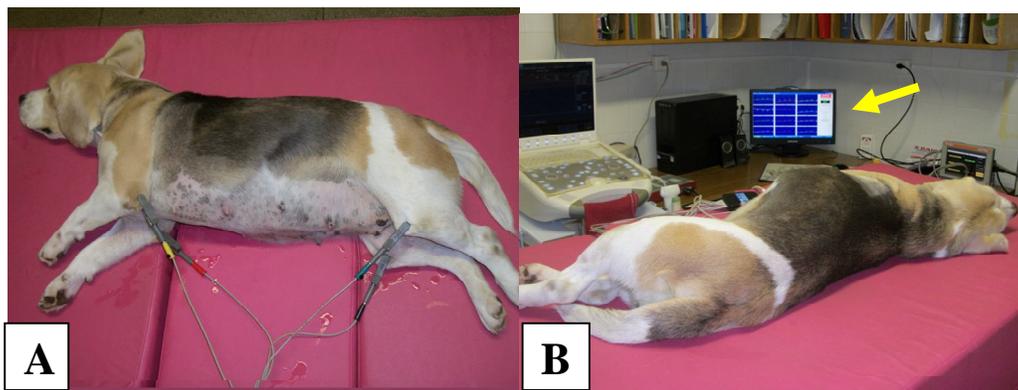


Figura 2-A) Cadela Beagle em decúbito lateral direito sendo submetida à eletrocardiografia computadorizada, com eletrodos de coloração amarelo, vermelho, verde e preto dispostos em membros torácico esquerdo, torácico direito, pélvico esquerdo e pélvico direito, respectivamente. **B)** Cadela Beagle em decúbito lateral direito sendo submetida à monitoração eletrocardiográfica, sendo o traçado exibido no monitor do computador (seta).

As análises dos registros foram realizadas na derivação DII (TILLEY, 1995), com obtenção dos seguintes parâmetros: ritmo e frequência cardíaca (bpm), duração (milissegundos) e amplitude (mV) da onda P e do complexo QRS, duração dos intervalos P-R

e Q-T, nivelamento do segmento S-T, amplitude da onda T e determinação do eixo cardíaco elétrico médio, no plano frontal, expresso em graus.

Os dados obtidos na fase experimental foram submetidos à análise estatística pelo programa de computador Jandel SigmaStat for Windows (SigmaStat for Windows, versão 3.0.1. Systat Software Inc - Richmond, CA, EUA). Estes dados foram comparados entre os tempos experimentais, dentro de um mesmo grupo e entre grupos (entre diferentes doses). Os resultados que apresentaram distribuição normal foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) para medidas repetidas, seguida do teste de Student-Newman-Keuls para comparação ao longo dos momentos dentro de cada grupo e ANOVA de uma via para comparação entre os grupos em cada momento. Para os dados que não apresentaram distribuição normal, empregou-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Student-Newman-Keuls. Considerou-se para o experimento um nível de significância de 5%.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos por meio da avaliação eletrocardiográfica após o uso das doses de 2mg/kg, 5mg/kg e 10mg/kg do LASSBio294, por via oral, estão apresentados nas tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1 - Médias e Desvios-padrão dos valores obtidos da frequência cardíaca, duração da onda P (ms), duração dos intervalos PR, QRS e QT, amplitude de P (mV), Q e R, e eixo cardíaco em cães da raça Beagle que receberam por via oral o protótipo a fármaco LASSBio 294 na dose de 2mg/Kg

Dose	Parâmetro	Basal	2 horas	4 horas	6 horas	12 horas	24 horas
2mg/Kg	FC (bpm)	90,20±5	85,60±8	75,80±5	76,40±5	87,00±13	84,40±8
	P(ms)	34,60±2	34,60±2	34,60±2	36,00±3	34,60±2	34,6±2
	PR(ms)	94,40±6	100,00±12	99,80±7	102,20±11	101,40±12	96,00±9
	QRS(ms)	51,00±4	56,80±9	58,60±4	59,40±7	56,60±5	57,40±3
	QT(ms)	197,80±10,94	219,60±17,85*	224,60±7,40*	228,80±11,27*	212,60±4,82*	211,40±8,90*
	P(mV)	0,19±0,03	0,18±0,04	0,19±0,03	0,18±0,02	0,18±0,03	0,19±0,03
	Q(mV)	0,06±0,07	0,07±0,07	0,06±0,06	0,06±0,07	0,05±0,05	0,06±0,06
	R(mV)	1,01±0,21	1,01±0,19	1,04±0,22	1,05±0,17	1,05±0,19	1,03±0,20
Eixo (°)	58,00±18,84	59,8±13,16	55,40±19,13	71,40±18,84	57,40±9,55	65,88±14,34	

* Parâmetros que apresentaram diferença estatística

Tabela 2 - Médias e Desvios-padrão dos valores obtidos da frequência cardíaca, duração da onda P (ms), duração dos intervalos PR, QRS e QT, amplitude de P (mV), Q e R, e eixo cardíaco em cães da raça Beagle que receberam por via oral o protótipo a fármaco LASSBio 294 na dose de 5mg/Kg

Dose	Parâmetro	Basal	2 horas	4 horas	6 horas	12 horas	24 horas
5mg/Kg	FC	91,40±10	90±9	81,6±11	83,6±13	90,6±16	81,6±8
	P(ms)	35,4±2	35,4±2	36±3	35,4±2	37,4±3	35,4±2
	PR(ms)	104,6±16	100±7	100±9	105,4±9	98,6±7	93,6±6
	QRS(ms)	56,8±5	55,2±7	59,2±7	58,6±6	55,2±5	58,2±7
	QT(ms)	215,2±14,49	223,8±29,89	234±8,60	213,2±11,9	216,2±12,2	216±13,74
	P(mV)	0,21±0,04	0,21±0,06	0,19±0,03	0,19±0,05	0,18±0,02	0,19±0,03
	Q(mV)	0,05±0,05	0,08±0,09	0,09±0,12	0,06±0,07	0,08±0,11	0,09±0,13
	R(mV)	1,04±0,20	1,03±0,20	1,01±0,21	1,02±0,16	1±0,2	1±0,17
Eixo(°)	41±18,6	46±9,6	61,2±30,25	43,8±22,21	48,8±16,66	56±14,83	

Tabela 3 - Médias e Desvios-padrão dos valores obtidos da frequência cardíaca, duração da onda P (ms), duração dos intervalos PR, QRS e QT, amplitude de P (mV), Q e R, e eixo cardíaco em cães da raça Beagle que receberam por via oral o protótipo a fármaco LASSBio 294 na dose de 10mg/Kg

Dose	Parâmetro	Basal	2 horas	4 horas	6 horas	12 horas	24 horas
10mg/Kg	FC(bpm)	88,4±6	77,2±7	91,2±9	87,2±18	92±13	94,2±13
	P(ms)	35,4±2	35,6±3	35,4±2	35,4±2	35,4±2	36,2±2
	PR(ms)	91,4±4	97,4±6	99,8±4	101,4±4	92,2±14	94,2±8
	QRS(ms)	58,8±5	58,2±6	54,8±6	57,6±8	55,4±6	54±4
	QT(ms)	218±17	220,6±17,20	211,4±18,83	216,8±14	206,8±18,35	222,6±38,12
	P(mV)	0,16±0,05	0,18±0,04	0,19±0,06	0,19±0,05	0,19±0,05	0,18±0,04
	Q(mV)	0,19±0,11	0,13±0,08	0,09±0,09	0,09±0,10	0,08±0,09	0,07±0,07
	R(mV)	1,08±0,21	1,05±0,14	1,07±0,19	1,11±0,17	1,09±0,17	1,13±0,21
Eixo(°)	65±10,45	59,2±7,7	47,8±3,75	60,4±11,3	64,2±13,1	63,2±8	

Os animais estudados não apresentaram nenhum efeito colateral à administração do LASSBio 294, tendo em vista que os mesmos não apresentaram reações adversas, alterações laboratoriais ou clínicas perceptíveis, como já observado em estudo piloto por PERSIANO & OLIVEIRA ALVES (2010), ao contrário de outros agentes inotrópicos, como a digoxina que tem efeitos arritmogênicos além de poder causar intoxicação digitalica (FRAGA & BARREIRO, 1996).

O decúbito lateral direito com um eletrodo acoplado em cada membro locomotor e toda a técnica utilizada foram ideais, conforme preconizado por TILLEY (1995) permitindo a

realização dos exames eletrocardiográficos de forma a favorecer a captação de imagens de boa qualidade.

Valores de referência para variáveis eletrocardiográficas têm sido publicados para diferentes raças de cães, incluindo Beagles (Petersen et al., 1951; Osborne & Leach 1971, Eckenfels & Trieb 1979, Detweiler 1981), e comparando com os resultados obtidos nestes estudos observou-se que todas as variáveis avaliadas estão dentro dos parâmetros normais para a espécie e raça, o que é muito importante, pois permite a avaliação mais precisa destes dados.

Durante os momentos de avaliação eletrocardiográfica, após administração do LASSBio 294, nenhuma cadela apresentou anormalidades de ritmo, sendo o ritmo predominante a arritmia sinusal respiratória. Também foi registrado o ritmo sinusal em alguns animais, corroborando com o descrito por SUDO et al., (2001), que perfundiou tecido cardíaco de ratos em diferentes concentrações de LASSBio 294 e observou significativo incremento na contração desses tecidos sem causar alterações de condução e nem arritmias, diferindo de outros compostos com ação terapêutica semelhante como os digitálicos que podem provocar arritmias (SPINOSA et al., 2006). O ritmo cardíaco é altamente variável em cães e pode ser alterado por tratamento medicamentoso ou condições experimentais, em particular o estresse e excitação. Devido a essas possíveis alterações, esses animais devem ser manipulados de forma cuidadosa para que não haja influência de fatores externos sobre os resultados do experimento.

Para os parâmetros avaliados neste experimento não foram detectadas diferenças estatísticas significativas entre a fase inicial, anterior à administração do fármaco, e as fases posteriores, à exceção do parâmetro duração do intervalo QT.

Quanto à avaliação da frequência cardíaca não foi observada diferença estatística dentro dos grupos para as doses de 2mg/Kg ($p = 0,058$), 5mg/Kg ($p = 0,426$) e 10mg/Kg ($p = 0,142$) e nem entre os grupos. Para a duração da onda P, e dos intervalos QRS e PR também não foram encontradas alterações significativas entre os grupos ou dentro deles, o que contraria o estudo feito por KITZEN, J. M. & WINBURY, M. M. (1989) que observaram redução progressiva da duração do intervalo PR em cães anestesiados submetidos ao uso de Pimobendan na dose de 1,0mg/Kg, sendo que esta redução foi mantida até quatro horas após a administração do fármaco. Em nossos resultados não foi possível correlacionar a frequência

cardíaca e o intervalo PR, diferente de SOLOVIEV et al. (2006) que observaram que o intervalo PR foi maior no período noturno, quando a frequência cardíaca foi menor.

Já para a duração do intervalo QT ocorreram diferenças estatísticas para os animais que receberam a dose de 2mg/Kg (Figura 3) pois houve aumento da duração do intervalo nos tempos duas, quatro, seis, 12 e 24 horas em relação ao tempo zero, e diminuição do intervalo QT nos tempos 12 e 24 horas quando comparados com o tempos, duas, quatro e seis horas. KITZEN, J. M. & WINBURY, M. M.(1989) observaram diminuição significativa do intervalo QT após trinta minutos da administração de 1mg/Kg de Pimobendan, sendo que esta foi mantida durante todo o período de observação.

Duração do intervalo QT

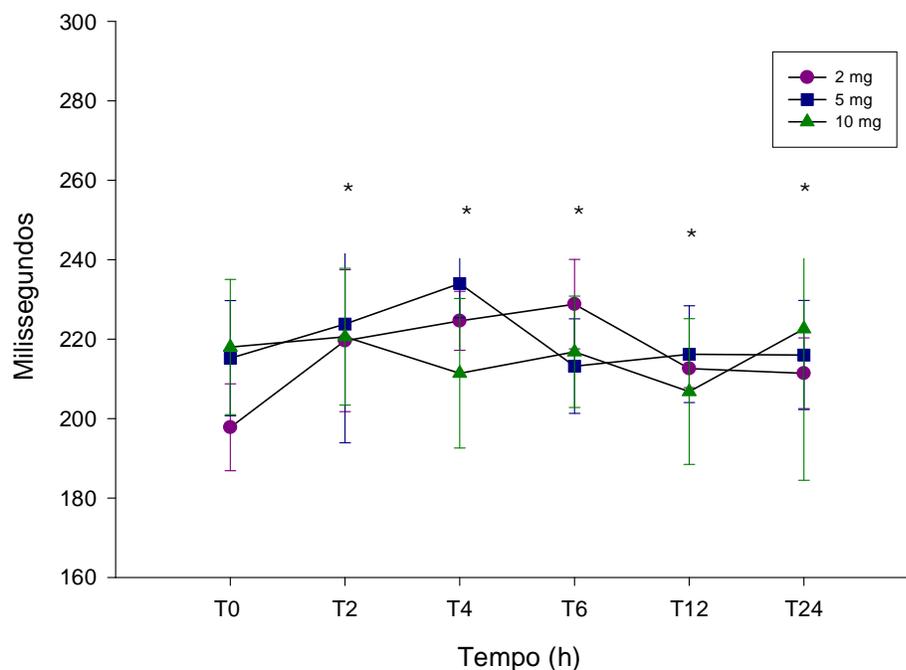


Figura 3- Representação gráfica da duração do intervalo QT de cães da raça Beagle que receberam por via oral o protótipo a fármaco cardiotônico LASSBio 294 nas doses de 2mg/Kg, 5mg/Kg e 10 mg/Kg.

Diferentemente de estudos realizados por DE PONTI et al. (2000) e HAVERKAMP et al. (2000) e REDFERN et al. (2003) que correlacionaram o aumento da frequência cardíaca com a diminuição do intervalo QT, onde esta elevação poderia estar

mascarando aumentos no intervalo QT, em nosso estudo esta relação não pode ser estabelecida uma vez que a frequência cardíaca não sofreu alterações. Para as doses de 5mg/Kg e 10mg/Kg não houve alterações significativas do intervalo QT dentro dos grupos e entre os grupos que receberam doses diferentes do fármaco.

Com relação à amplitude da onda P, não foram observadas alterações significativas, diferentemente de HANTON, G & RABEMAMPIANINA, Y (2006) que observaram uma correlação significativa entre a frequência cardíaca e a amplitude da onda P, sendo que o coeficiente de correlação manteve-se baixo, indicando que apenas uma pequena parte da variabilidade da amplitude da onda P pode ser atribuída a mudanças ocorridas na frequência cardíaca. Para a duração do intervalo QRS não foram encontradas alterações nos dados estatísticos assim com para KITZEN et al. (1989) em seus experimentos com utilização do fármaco cardiotônico pimobendam.

Para a amplitude da onda T não foram encontrados valores estatísticos significativos, assim com para o eixo cardíaco (expresso em graus). Não foram observadas alterações dentro dos grupos que receberam a mesma dose e nem entre os grupos que receberam diferentes concentrações do LASSBio 294. Tais dados não foram passíveis de confronto com a literatura consultada devido à ausência de estudos semelhantes.

5- CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o LASSBio 294 é um candidato a fármaco promissor pois, nas diferentes concentrações utilizadas (2mg/Kg, 5mg/Kg e 10mg/Kg) não provocou arritmias nas cadelas avaliadas.

Além disso, pode ser considerado seguro uma vez que não causou efeitos colaterais em nenhuma das cadelas submetidas às avaliações.

Com relação à dose, pode-se dizer que o LASSBio 294, administrado em dose única, não é um fármaco dose-dependente, já que a alteração ocorrida no intervalo QT na dose de 2m/Kg não persistiu ou evoluiu com o aumento da dose.

6- REFERÊNCIAS

BARREIRO, E. J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. **Química Nova**. Rio de Janeiro, v.25, n. 6B, p.1172-1188, 2002.

BUCHANAN, J.W. Prevalence of cardiovascular disorders. In: FOX, P.R.; SISSON, D.; MOÏSE, N.S. **Textbook of canine and feline cardiology: principles and clinical practice**. 2.ed. Philadelphia: W. B. Saunders, p.457-470, 1999 [[Links](#)]

CARELOCK, J.; CLARK, A.P. Heart failure: pathophysiologic mechanisms: the same neurohormonal actions that initially preserve cardiac output subsequently cause functional deterioration. New drug breakthroughs may provide a solution. **American Journal of Nursing**. New York, v.101, p.26-33, 2001.

CZINER D.G. & LEVIN R.I. The cardiomyopathy of Duchenne's muscular dystrophy and the function of dystrophin. **Medical Hypotheses**, New York, v.40, p.169-173, 1993.

DE PONTI, F., POLUZZI, E., & MONTANARO, N. QT-interval prolongation by non-cardiac drugs: Lessons to be learned from recent experience. **European Journal of Clinical Pharmacology**, Heidelberg, v.56, p.1-18, 2000.

DETWEILER DK . The use of electrocardiography in toxicological studies with beagle dogs. In: *Cardiac Toxicology* (Balazs T, ed). Florida: CRC Press, p.33-82, 1981.

ETTINGER, S.J. Cardiac arrhythmias diagnosis and treatment. In: ETTINGER, E. BONAGURA, E. **Os Recentes Avanços da Cardiologia Veterinária**, São Paulo: Anais Ettinger e Bonagura, 1997.

ECKENFELS A, TRIEB G. The normal electrocardiogram of the conscious beagle dog. **Toxicology and Applied Pharmacology**. Califórnia, v.47, p.567-84, 1979.

FRAGA, C.A.M., BARREIRO, E.J. Cardiotônicos: Histórico e perspectivas de uma antiga e importante classe de agentes terapêuticos. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v.12, n.2, p.182-189, 1996.

HAMMOND, T.G., CARLSSON, L., DAVIS, A.S., ET AL. Methods of collecting and evaluating non-clinical cardiac electrophysiology data in the pharmaceutical industry: results of an international survey. **Cardiovasc. Research**. Oxford, v.49 n.4, p.741-750, 2001.

HANTON, G & RABEMAMPIANINA, Y. The electrocardiogram of the Beagle dog:reference values and effect of sex, genetic strain, body position and heart rate. **Laboratory Animals**. London, v.40, p. 123–136, 2006

HAVERKAMP, W., BREITHARDT, G., CAMM, A. J., JANSE, M. J., ROSEN, M. R., ANTZELEVITCH, C. The potential for QT prolongation and pro-arrhythmia by non-anti-arrhythmic drugs: Clinical and regulatory implications. Report on a Policy Conference of the European Society of Cardiology. **Cardiovascular Research**. Oxford, v.47, p.219-233, 2000.

KINTER, L.B., SIEGL, P.K., AND BASS, A.S. New preclinical guidelines on drug effects on ventricular repolarization: safety pharmacology comes of age J. **Pharmacol. Toxicol. Methods**. Copenhagen, v.49, n3, p.153–158, 2004.

KITZEN, J.M.; WINBURY, M.M. Pimobendan. **Cardiovascular Drug Reviews**. New York, v.6, n.4, p.265-291, 1989.

LIMA, P.C. LIMA, L.M. SILVA, K.C.M. LÉDA, P.H.O. MIRANDA, A.L.P. FRAGA, C.A.M. BARREIRO, E.J. Synthesis and analgesic activity of novel N-acylarylhydrazones and isosters, derived from natural safrole, **Eur. J. Med. Chem.**, Heidelberg V.35, p.187-203, 2000.

OSBORNE, B.E., LEACH, G.D.H. The beagle electrocardiogram. **Food and Cosmetics Toxicology**. Oxford, v.9, p.857-64, 1971.

PACIORETTY L.M., COOPER B.J. & GILMOUR JR R.F. Cellular and molecular biology: Reduction of the transient outward potassium current in canine X-linked muscular dystrophy. *Circulation*. Kyoto, v.90, n.3, p.1350-1356, 1994.

PERSIANO, C.B.; OLIVEIRA ALVES, R. Identificação de Metabólitos Gerados após a Administração de um novo Protótipo a Fármaco Cardiotônico (LASSBio 294) em cães. **Anais do Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão - VII CONPEEX**. Goiânia p. 4644-4656, 2010.

PETERSEN ES, RICKETTS HT, BREWER NR, LINTS HA, Test CE, Tupikova NA Electrocardiogram of the Beagle dog. **Proceedings of the Society of Experimental Biology**. New York, v.77, p.330–339, 1951.

REDFERN, W. S., CARLSSON, L., DAVIS, A. S., LYNCH, W. G., MACKENZIE, I., PALETHORPE, S. Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: Evidence for a provisional safety margin in drug development. **Cardiovascular Research**. Oxford, v.58, p.32– 45, 2003

ROSSI NETO, J. M. A dimensão do problema da insuficiência cardíaca do Brasil e do mundo. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**. São Paulo, v.14, n.1, p. 1-10, 2004.

SCHLESINGER, D.P.; RUBIN, S.I. Potential adverse effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors in the treatment of congestive heart failure. The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian. Baltimore, v.16, p.275-283, 1994. [[Links](#)]

SCHLOTZHAUER, S.; LITTEL, R.C. **SAS® system for elementary statistical analysis**. 2. ed. Cary, NC: SAS Institute, p. 456, 1997

SOARES, E.C.; LARSSON, M.H.M.A. Aspectos clínicos-epidemiológicos da doença valvar crônica. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**. Niterói, v.10, n.1, p.3-9, 2003.

SOLOVIEV, M.V., HAMLIN, R.L., SHELLHAMMER, L.J., BARRET, R.M., WALLY, R.A., BIRCHMEIER, P.A., SCHAEFER, G.J. Variations in hemodynamic parameters and ECG in healthy, conscious, freely moving telemetrized beagle dogs. **Cardiovascular Toxicology**, New York, v. 6, p. 51-62, 2006.

SPINOSA, H. S.; GORNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada a Medicina veterinária**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, p.897, 2006.

SUDO, R.T.; ZAPATA-SUDO, G.; BARREIRO, E.J. The new compound, LASSBio 294, increases the contractility of intact and saponin-skinned cardiac muscle from Wistar rats. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 134, p. 603-613, 2001.

TILLEY, L. P. **Essentials of canine and feline electrocardiography**. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, p.470, 1995.

WOLF, R.; CAMACHO, A. A.; SOUZA, R. C. A. Eletrocardiografia computadorizada em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, n.6, p.610-615, 2000.