

Sérgio Diogo Giannini *
Fernando Sogorbi Sanchis **
José Luiz Guerra ***
José Luiz Merusse ****

Lesões cardiovasculares induzidas em ratos pela vitamina D. Possível efeito protetor da sulfinpirazona

Superdosagem de vitamina D (300.000 U/dia) determina em ratos lesões miocárdicas (extensas áreas de necrose e focos inflamatórios) e vasculares (necrose, degeneração, hialinização) que levam à morte dentro dos primeiros quatro dias. A administração prévia ou simultânea de sulfinpirazona (S) (1 mg/dia) mostrou-se capaz de proteger os animais à ação deletéria da vitamina D. Para verificar se a proteção conferida pela sulfinpirazona dependia de propriedades antiinflamatórias e/ou antiagregantes plaquetária, os autores planejaram investigação em que outras drogas (oxifenibutazona - OX e dipiridamol-DP) com propriedades semelhantes foram testadas.

Foram usados 10 grupos, cada um com 10 ratos de cepa Wistar, os quais receberam o seguinte tratamento: grupo I - vitD (300.000 U/dia/4 dias); grupo II - S (1 mg/dia/4 dias); grupo III - DP (1 mg/dia/4 dias); grupo IV - OX (1 mg/dia/4 dias); grupos V, VI e VII receberam por 4 dias as mesmas doses de S, DP e OX, seguidas por 4 dias de vitD; grupos VIII, IX e X receberam S, DP e OX por 8 dias e vitD simultânea, a partir do 5.º dia.

Os autores observaram mortalidade de 100% dos animais dos grupos I, VI, VII, IX e X, a morte ocorrendo após 48 horas da administração da vitD. A S foi capaz de proteger 100% dos animais do grupo VIII, havendo apenas uma morte no grupo V. Do ponto de vista histopatológico, lesões intensas necróticas e inflamatórias do miocárdio, vasos e rins foram verificadas nos animais dos grupos I, VI, VII, IX e X e, embora presentes, elas foram de pequena intensidade nos ratos dos grupos V e VIII. A S foi capaz, portanto, de conferir proteção aos órgãos atingidos pela administração de superdosagem da vitamina D, mas não se conhecem os mecanismos responsáveis, embora seja admissível uma ação direta sobre as membranas celulares, impedindo a ação agressora.

A administração da vitamina D (vitD) a ratos determina lesões cardiovasculares que variam em função da dose em que ela é usada. Doses pequenas (inferiores a 300.000 U/Kg/dia), por período superior a um mês, provocam alterações na parede da artéria exteriorizada por seu caráter metacromático e PAS positivo¹. A mesma dose empregada por 4 dias em animais que recebem um mês de ração contendo colesterol e ácido deidrocolico, leva a modificações estruturais da artéria que têm as características da aterosclerose humana^{2,3}. Doses elevadas da vitD (300.000 U/dia) condicionam, segundo nossas observações pessoais, após 3 a 4 dias, morte dos animais pela ocorrência de extensas áreas de necrose e reação inflamatória intensa do miocárdio, além de levar à formação

de lesões degenerativas, necróticas e hialinizadas da parede das artérias, que se apresentam, em alguns segmentos, como depósitos de substância morfológicamente semelhante ao Cálcio⁴. O modelo experimental que se obtém com superdosagem de vitD pode, portanto, ser útil para comprovar e avaliar eventual efeito de drogas apontadas como capazes de diminuir a mortalidade por necrose miocárdica.

Em experimentos preliminares, tivemos a oportunidade de observar que a evolução habitual de ratos submetidos a doses elevadas de vitD era modificada pela administração de sulfinpirazona (S)^{*}. Considerando que a S possui,

* Observação piloto não publicada.

* Professor livre-docente - Departamento de Clínica da FMUSP; Instituto do Coração do HC da M USP.

** Professor-adjunto da Disciplina de Animais de Laboratório - Departamento de Patologia e Clínica Médica FMVUSP.

*** Professor-colaborador da Disciplina de Anatomia Patológica do Departamento de Patologia e Clínica Médica da FMVUSP.

**** Professor-colaborador da Disciplina de Animais de Laboratório do Departamento de Patologia e Clínica Médica da FMVUSP.

entre outras, propriedades antiinflamatória e antiagregante plaquetária propusemo-nos a compará-la com outras drogas com efeitos semelhantes, para verificar se os resultados obtidos com a S dependiam desses efeitos.

O presente trabalho expõe os resultados da comparação entre ratos que receberam superdosagem de vitD e foram tratados com S, com dipiridamol (DP) ou com oxifenilbutazona (OX).

Material e métodos

Foram utilizados 100 ratos machos da cepa Wistar, pesando aproximadamente 50 g, sendo distribuídos aleatoriamente em grupos de 10 (grupos I a X). Os grupos I a IV foram usados como controles da experimentação. Assim o grupo I recebeu apenas vitD; o grupo II, exclusivamente S; o grupo III, DP e o grupo IV, OX. Não ocorrendo a morte do animal durante a investigação, ele era sacrificado no 4.º dia.

Os grupos V, VI e VII receberam durante quatro dias, respectivamente, S, DP e OX e, a seguir, vitD por período de até 4 dias, caso não ocorresse o óbito. Os grupos VIII, IX e X receberam, durante 8 dias, respectivamente, S, DP e OX e, a partir do 5.º dia, vitD. Os animais sobreviventes foram sacrificados no 8.º dia.

As doses utilizadas durante todo o transcurso da experimentação foram sempre as mesmas: vitD, 300.000 U/dia; S, DP e OX, 1 mg/dia, dividida em duas frações de 0,5 mg, administradas por sonda.

O esquema geral da investigação consta do quadro I.

Quadro I - Esquema da administração da vitamina D, sulfipirazona, dipiridamol e oxifenilbutazona.

Dias	Mortalidade (%)							
	Grupos § e drogas							
I	VITD *				100			
II	S **				0			
	DP ***				0			
IV	OX ****				0			
V	S		VITD		10			
VI	DP		VITD		100			
VII	OX		VITD		100			
VIII	S		S + VITD		0			
IX	DP		DP + VITD		100			
X	OX		OX + VITD		100			

* VITD = Vitamina D₃ (300.000 U/dia)

** S = Sulfipirazona (1 mg/dia)

** DP = Dipiridamol (1 mg/dia)

**** OX = Oxifenilbutazona (1 mg/dia)

§ Cada grupo com 10 ratos.

Foi feita observação diária dos animais para anotação de eventuais modificações clínicas. Os exames anatomo-

patológicos (macro e microscópicos) foram feitos por patologista que desconhecia o grupo a que pertencia cada animal. Para estudo histológico foram feitos cortes do coração, aorta, rim e fígado e, para coloração, usou-se o método da hematoxilina-eosina. Em função de determinados achados, realizaram-se colorações adicionais (Von Kossa e Verhoff).

Para estabelecer a intensidade das lesões, utilizaram-se critérios semiquantitativos, classificando-as em graus de 1 a 4.

Resultados

Avaliação clínica - Nos grupos II, III e IV não foram observadas quaisquer modificações clínicas, sendo normais os aspectos e comportamento dos animais durante toda a experimentação.

A evolução clínica dos animais dos grupos I, VI, VII, IX e X foi uniforme, surgindo, a partir do 2.º dia de administração da vitD, as seguintes manifestações: pelos arrepiados, diarreia, adinamia, taquipnéia e aspecto agonizante, com morte de todos no 3.º e 4.º dias.

Os ratos do grupo V apresentaram, a partir da segunda dose de vitD, pelos arrepiados e discreta diarreia, manifestações nitidamente menos intensas que as observadas nos grupos I, VI, VII, IX e X, havendo morte de um único animal no 8.º dia.

Os ratos do grupo VIII tiveram manifestações semelhantes às do grupo V, mas nenhum animal morreu.

Avaliação anatomo-patológica - Os aspectos macro e microscópicos nos grupos II, III e IV foram normais.

A análise macroscópica dos órgãos internos dos ratos dos grupos I, VI, VII, IX e X mostrou um aumento do volume do coração, que se apresentava amarelado, sendo pouco expressivas as modificações nos demais órgãos. O exame microscópico, entretanto, revelou acentuadas alterações, sobretudo do miocárdio, da parede dos vasos e dos rins, ficando o fígado totalmente preservado. No miocárdio, estavam presentes: a) acentuado infiltrado inflamatório, com neutrófilos, linfócitos e macrófagos nos interstícios; b) necrose difusa de fibras miocárdicas, c) vasos com paredes de estrutura desorganizada, hialinizadas e com eventual depósito de uma substância semelhante ao cálcio, "Von Kossa negativa". No rim, observou-se quadro de necrose tubular, com deposição de substâncias basófilas e granulosa na luz tubular, bem como nos interstícios. A intensidade das lesões em todos os cortes foi classificada como de grau 4.

Não foram identificadas quaisquer alterações macroscópicas nos órgãos dos ratos dos grupos V e VIII. Microscopicamente, encontraram-se alterações semelhantes às observadas nos grupos I, VI, VII, IX e X, mas com caráter menos difuso e com intensidade menor, sendo classificadas como de grau 2 as do grupo V e de grau 1 as do grupo VIII.

Comentários

Investigações experimentais em ratos, desenvolvidas por Selye ⁵, demonstraram a acen-

tuada capacidade agressora de doses elevadas de vitD para o miocárdio e para as artérias, exteriorizadas por lesões necróticas, não acompanhadas por reação inflamatória da região afetada que, segundo o autor, aparece apenas com a administração simultânea de fosfato ácido de sódio, adquirindo características de miocardite do tipo purulento. Contudo, de forma puramente acidental, administrando a ratos doses de 300.000 U diárias de vitD, tivemos a oportunidade de observar que, dentro de 4 dias, ocorria morte de todos os animais, havendo lesões do músculo cardíaco superponíveis às que Selye supunha como apenas possíveis quando a vitD era associada ao NaH PO₄.

A necrose e a acentuada inflamação, determinadas no miocárdio pela vitD, poderiam resultar de um ou mais dos seguintes mecanismos: 1) ação tóxica direta sobre as células endoteliais aos vasos e sobre as fibras miocárdicas; 2) trombose ao nível dos vasos da microcirculação por liberação de substâncias facilitadoras da agregabilidade plaquetária; 3) hiperplasia acentuada das células miointimais, por ação de enzimas liberadas pelas células endoteliais danificadas ou destruídas. É importante ressaltar, no entanto, que lesões muito semelhantes são também desencadeadas por inoculação subcutânea de isoproterenol⁶, podendo-se, pois, aventar a hipótese de que a superdosagem de vitD possa levar à liberação de grandes quantidades de catecolaminas, com conseqüente dano ao músculo cardíaco e paredes arteriais.

Se os danos causados pela vitD dependessem exclusivamente das ações acima indicadas, seria admissível, teoricamente, que eles deveriam ser total ou parcialmente bloqueados com as drogas usadas nesta investigação. De fato, a OX e a S apresentam propriedades comuns, mas sabe-se que é muito maior a capacidade antiinflamatória da primeira⁷. Logo, os resultados obtidos nesta experimentação não dependeram dessa propriedade. Obviamente, também não pareceram relacionados exclusivamente à atividade antiagregante, comum às três drogas ensaiadas, pois, ainda que a cada uma delas correspondesse intensidade de ação diferente (o que não ocorreu), seria lícito esperar proteção tanto nos animais que receberam S, quanto naqueles tratados com DP ou OX, mas, isto não foi observado. Achado incontestável foi a menor intensidade das reações inflamatórias e necróticas apenas nos animais que receberam S, indicando menor repercussão da superdosagem de vitD empregada.

Innes e Weisman⁸ demonstraram que a S tem a capacidade de reduzir o tamanho de áreas de infarto induzidas em ratos por isoproterenol. Para explicar este achado, os autores relacionam vários mecanismos de ação de S: 1) prolongamento da vida das plaquetas e redução do seu "turnover"⁹; 2) inibição da agregabilidade¹⁰ e da adesividade plaquetárias¹¹; 3) impedimento da liberação de serotonina das plaquetas¹²; 4) estimulação da atividade fibrinolítica¹³; 5) inibição da conversão de ácido araquidônico em endoperóxidos cíclicos, com menor formação de tromboxane A₂¹⁴; 6) soma das ações acima

descritas, com a menor possibilidade de formação de trombos¹⁵. No entanto, as drogas por nós usadas apresentam uma ou mais das ações acima descritas e, com exceção da S, não foram capazes de conferir "proteção" decorrente de algum efeito adicional desconhecido (ou efeitos adicionais) e, por si, capaz de reduzir os danos da vitD. Essa particularidade poderia explicar resultados mais expressivos da S em relação a outras drogas usadas no homem com o objetivo de diminuir índices de mortalidade por infarto do miocárdio¹⁶⁻¹⁹.

Assinale-se ainda que essa "proteção" ocorreu também nos animais do grupo V, que receberam a S apenas durante 4 dias e que, apesar de suspensa a droga, não foram atingidos pelo vitD como os dos grupos VI, VII, IX e X que receberam DP e OX

Investigações em ratos²⁰ demonstraram que a S tem seu efeito máximo entre 3 e 18 horas e, em relação à atividade de geração de prostaglandinas plaquetárias, ela desaparece unicamente após 36 horas. É provável que ações não conhecidas sobre a membrana celular sejam mais duradouras, impedindo a ação de agentes agressores.

Summary

The overdosage of vitamin D (300.000 U day) in rats, determines myocardic lesions (large areas of necrosis and inflammatory/focuses and vascular lesions (necrosis, degeneration, hialinization) which leads to death in the first, four days. The previous or simultaneous administration of sulphinpyrazone (S) (1mg/day) seemed to be able of protecting the animals from the deleterious action of vitamin D. In order to check whether this effect of sulphinpyrazone depended on antiinflammatory and/or platelets antiaggregating properties, the author planned an investigation to test other drugs (oxiphenbutazone - OX and dipyridamole -DP) with similar actions.

Then groups of 10 Wistar rats each received the following treatment: group I - vitamin D (300.000 U/day) - during four days; group II - sulphinpyrazone (1mg/day) - during four days; group III - dipyridamole (1mg/day) - during four days; group IV - Oxiphenbutazone (1mg/day) - during four days; groups V, VI and VII received during four days the same doses of S, DP and OX followed by four days of vitamin D administration; groups VIII, IX and X received S, DP and OX during eight days and vitamin D from the 5th day, simultaneously.

The authors observed 100% of mortality of the animals from groups I, VI, VII, IX and X: deaths occurred after 48 hours of vitamin D administration. The sulphinpyrazone was able to protect 100% of the animals from group VIII; only one death occurred in group V. From the histologic point of view, intense necrotic and inflammatory lesions of the myocardium, blood vessels and kidneys were found out in the animals from groups I, VI, VII, IX and X but, though these lesions were present they were of small intensity in the rats from groups V and VIII.

In conclusion, the sulfinpyrazone was able to protect the organs affected by vitamin D overdosage, but the underlying mechanisms are unknown, however a direct action on the cellular membrane impeding the noxious action is probable.

Referências

1. Gillman, T.; Grant, R. A.; Hathorn, M. - Histochemical and clinical studies of calciferol induced vascular injuries. *Br. J. Exp. Path.* 41: 1, 1957.
2. Aubert, D.; Ferrand, J. C.; Lacaze, B.; Pepin, O.; Panak, E.; Podesta, M. - Athérogénèse expérimentale chez le rat Wistar. *Atherosclerosis*, 20: 263, 1974.
3. Giannini, S. D.; Sanchis, F. S.; Cury, C. G. C. - Aterosclerose experimental em ratos Wistar submetidos a dietas hipoprotéicas. *Arq. Bras. Cardiol.* 35: 47, 1980.
4. Giannini, S. D.; Sanchis, F. S.; Guerra, J. L.; Merusse, J. L. - Indução experimental de lesões cardiovasculares pela vitamina D em ratos. Apresentado na 1a. Semam de Veterinária da Fac. Med. Veterinária da USP - Zootecnia, novembro, 1982.
5. Selye, H. - Humoral conditioning for the production of suppurative, acute myocarditis by the oral administration of sodium phosphate. *Am. Heart J.* 55: 1, 1958.
6. Rona, G.; Kahn, D. S.; Chappel, C. I. - Studies on infarct like - myocardial necrosis produced by isoproterenol: a review. *Rev. Can. Biol.* 22: 241, 1963.
7. Moser, P.; Jakel, K.; Krupp, P.; Menassé, R.; Sallmann, A. - Structure-activity relations of analogs of phenylbutazone. *Eur. J. Med. Chem.* 10: 613, 1975.
8. Innes, I. R.; Weisman, H. - Reduction in the severity of myocardial infarction by sulfinpyrazone. *Am. Heart J.* 102: 153, 1981.
9. Smythe, H. A.; Ogryzlo, M. A.; Murphy, E. A.; Mustard, J. F. - The effect of sulfinpyrazone (Anturan) on platelet economy and blood coagulation in man. *Can. Med. Assoc. J.* 92: 818, 1965.
10. Wiley, J. S.; Chesterman, C. N.; Morgan, F. J.; Catald, P. A. - The effect of sulfinpyrazone on aggregation and release reactions of human platelets. *Thromb. Res.* 14: 23, 1979.
11. Essien, E. M.; Mustard, J. F. - Inhibition of platelet adhesion to rabbit aorta by sulfinpyrazone and acetylsalicylic acid. *Atherosclerosis*, 27: 89, 1977.
12. Ali, M.; Mc Donald, J. W. D. - Effect of sulfinpyrazone on platelet prostaglandin synthesis and platelet release of serotonin. *J. Lab. Clin. Med.* 89: 868, 1977.
13. Ruegg, M. - Antithrombotic effect of sulfinpyrazone in animals: influence on fibrinolysis and sodium arachidonate-induced pulmonary embolism. *Pharmacology*, 14: 522, 1976.
14. Mehta, J.; Mehta, P. - Status of antiplatelet drugs in coronary heart disease. *JAMA*, 241: 2649, 1979.
15. Kaegi, A.; Pineo, G. F.; Shimigu, A.; Trivedi, H.; Hirsh, J.; Gent, M. - Arteriovenous shunt thrombosis: prevention by sulfinpyrazone. *N. England J. Med.* 290: 304, 1974.
16. The anturane reinfarction trial research group: sulfinpyrazone in the prevention of sudden death after myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 298: 289, 1978.
17. Aspirin myocardial infarction study research group. A randomized controlled trial of aspirin in persons recovered from myocardial infarction. *JAMA*, 243: 661, 1980.
18. The persantine-aspirin reinfarction study research group: persantine and aspirin in coronary heart disease. *Circulation*, 62: 449, 1980.
19. Anturane reinfarction trial research group, - Sulfinpyrazone in the prevention of sudden death after myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 302: 250, 1980.
20. Livio, M.; Villa, S.; Caetano, G. - Long lasting inhibition prostaglandin but normal vascular prostacyclin generation following sulfinpyrazone administration to rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 32: 718, 1980.