

AValiação DO POTENCIAL CARDIOTÓXICO DO VP-16 ATRAVÉS DE UM MODELO EXPERIMENTAL UTILIZANDO RATAS ALBINAS:

Discussão de Achados Anátomo-Patológicos*

GILBERTO SCHWARTSMANN¹, CARMEM LÚCIA OLIVEIRA DA SILVA²,
LUCAS P. TEIXEIRA³, LUIZA RANGEL⁴, RICHARD R. GURSKI⁵,
FÁBIO SEGAL⁵, LÍGIA B. COUTINHO⁶, MARIA MARQUES⁷.

Instituto de Biociências – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre – RS.

RESUMO

A existência de relatos ocasionais de cardiotoxicidade pelo VP-16 motivou os autores a realizarem este estudo. Para tal, um modelo experimental utilizando dois grupos de ratas Albinas (grupo A e grupo B) foi idealizado. Os animais do grupo A foram divididos em sub-grupos de 10 (G1, G2, G3, G4 e G5), sendo tratados com VP-16-213 5mg/kg de peso por via intraperitoneal em ciclos semanais pelo prazo de oito ciclos. O grupo B recebeu solução de cloreto de sódio isotônico (0,9%) pelo mesmo espaço de tempo. Os animais do grupo A foram sacrificados a intervalos de 14 dias, segundo a ordem dos sub-grupos tratados. Os animais do grupo B foram sacrificados ao término do experimento. A avaliação anatomopatológica dos corações de animais do grupo A não diferiu significativamente entre os sub-grupos, a despeito das doses crescentes da droga. Quando estes achados foram confrontados com os do grupo B, não foram detectadas diferenças significativas entre as amostras (P menos de 0.05). Isto permite aos autores concluir pela ausência de cardiotoxicidade pela droga, o que sugere que as descrições prévias de literatura devam decorrer de fatores não-associados ao uso de droga.

UNITERMOS: VP-16, cardiotoxicidade.

INTRODUÇÃO

Dentre os diversos derivados das podofilotoxinas sintetizadas nos últimos anos, o VP-16 (4'-demetilepipodofilotoxina 9-4, 6-O-etilideno-beta-D-glicopiranosídeo), registrado como NCS-141540, é talvez o de maior índice terapêutico em tumores experimentais e humanos¹. Sua farmacocinética tem sido investigada através da técnica de cromatografia líquida de alta-pressão, principalmente em carcinoma de pulmão tipo Lewis².

Inicialmente tida como uma droga inibidora do fuso mitótico, este mecanismo parece ser de importância secundária dentro de doses farmacológicas. Sua ação mais provável parece derivar de indução de quebras em bandas de DNA³, além de bloqueios nas fases S, G2 e pré-mitótica⁴. A

atividade clínica de droga tem sido amplamente demonstrada em uma série de neoplasias, sobretudo tumores de linhagem linfoproliferativa⁵, carcinoma de pequenas células do pulmão⁶ e tumores embrionários⁷.

Ainda que a toxicidade do VP-16 se restrinja basicamente à medula óssea⁸ e ao trato gastrointestinal⁹, alopecia¹⁰, reações de hipersensibilidade¹⁰, hipotensão após infusão endovenosa rápida¹¹, e alterações no perfil hepático¹⁰ têm sido descritas.

Neste estudo, os autores atentam para um raro efeito colateral atribuído à droga, qual seja, o desenvolvimento de dano cardíaco¹². Ainda que existam algumas referências ocasionais de surgimento de cardiopatia na vigência do uso do VP-16^{13, 14}, isto é muito pouco consistente na literatura, além de não haver nenhum estudo me-

* Projeto mantido pelo CNPq-MEC (1984).

¹Médico do Setor de Oncologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Pesquisador pelo CNPq-MEC. Fellow em Oncologia pela Universidade de Londres. ²Bolsista do CNPq-MEC. ³Monitor do Departamento de Fisiologia da UFRGS. ⁴Acadêmica da Faculdade de Medicina da UFRGS. ⁵Acadêmico da Fundação Faculdade de Ciências Médicas de Porto Alegre. ⁶Professor-Adjunto do Departamento de Patologia da UFRGS. ⁷Chefe do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da UFRGS. Pesquisador pelo CNPq-MEC. Endereço para correspondência: ¹, Rua dos Andradas, 1711/701 – Porto Alegre – R.S. – CEP 90.000.

todologicamente adequado endereçado a este problema. Tendo esta controvérsia como base, os autores idealizaram um modelo experimental no rato, através de um estudo-controlado, no qual os achados anatomopatológicos em miocárdio de animais tratados com VP-16 foram confrontados com os de controles tratados apenas com solução de cloreto de sódio isotônico (0,9%).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas ratas Albinas procedentes do Biotério do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os grupos foram designados como A e B. No grupo A, foram incluídos 50 animais, os quais foram subdivididos em cinco sub-grupos de 10 animais cada um (sub-grupos 1, 2, 3, 4 e 5). No grupo B, foram incluídos 10 animais. O peso médio ao início do experimento foi de 185 gramas (160-196) e a idade média de 114 dias (108-126). Os animais foram mantidos em gaiolas polipropileno com 40 x 30 x 16 centímetros, contando cinco animais por gaiola. Os animais receberam ração-padrão e água "ad libitum". A totalidade dos animais foi mantida em uma sala do Biotério do Instituto de Biociências da UFRGS (sala 7), com ventilação constante, à temperatura ambiente e com entradas na sala apenas para alimentação, limpeza e realização do experimento (no máximo cinco pessoas por vez, ao máximo cinco vezes ao dia).

Os animais receberam tratamento segundo protocolo anexo (quadro 1). No grupo A, foram administradas injeções intraperitoneais de VP-16 (VEPESID 100 mg^R, Laboterápica Bristol — Química e Farmacêutica Ltda.) na dose de

5mg/kg de peso semanalmente por oito semanas. Os animais deste grupo foram sacrificados a intervalos de duas semanas, de acordo com a ordem dos sub-grupos 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente.

Os animais do grupo B foram tratados com solução de cloreto de sódio isotônica (0,9%) semanal por via intraperitoneal durante oito semanas, sendo após sacrificados ao fim do experimento.

Uma vez sacrificados, os animais de cada grupo foram toracotomizados, tendo o coração sido retirado, no limite dos vasos da base, e encaminhado para estudo anatomopatológico, sob a responsabilidade de um de nós (L. B. C.) no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UFRGS. Inicialmente, após a retirada do órgão, um fragmento da ponta do ventrículo esquerdo foi removido com lâmina de bisturi convencional e encaminhado para estudos em microscopia eletrônica no Setor de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da UFRGS. Em seguida, os corações foram pesados em conjunto (n=10) e procedida a inspeção do órgão. Os corações foram seccionados transversalmente, na altura do terço superior dos ventrículos, incluindo as válvulas cardíacas (ver figura 1). Os cortes foram de 0,5 centímetros de espessura. As amostras colhidas foram processadas em Auto-technicon Ultra e incluídas em blocos de parafina, seccionados após em Micrótomo Spencer "8202" na espessura de 5 micra. Os cortes foram corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina e examinados em microscópio Carlzeiss-Jena no Departamento de Patologia da UFRGS. Os achados anatomopatológicos foram descritos segundo a macroscopia (inspeção em cortes) e microscopia óptica (características das fibras

QUADRO 1 — Protocolo de Estudo

	1	8	15	22	29	DIAS 36	43	50	57	63
GRUPO A (n=50)										
VP-16 5mg/kg IP										
G1 (n=10)	*									
G2 (n=10)	X	X	*							
G3 (n=10)	X	X	X	X	*					
G4 (n=10)	X	X	X	X	X	X	*			
G5 (n=10)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*
GRUPO B (n=10)										
Solução de Cloreto de Sódio 0,9%	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*

X dias de administração da droga

* dias de sacrifício dos animais

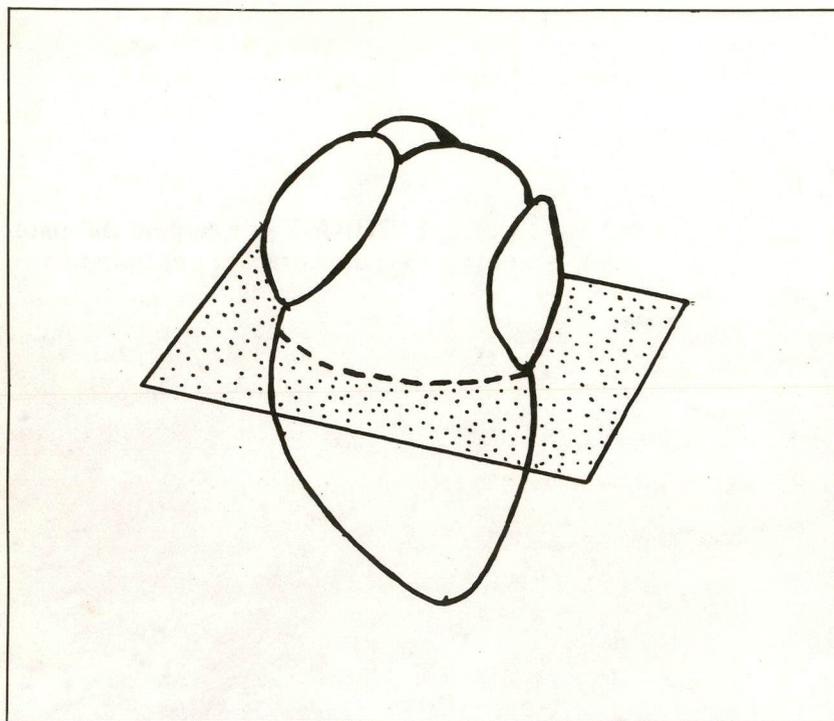


FIGURA 1 – Técnica de padronização dos cortes.

miocárdicas, busca de zonas de necrose, degeneração tecidual, manifestações de cardite, alterações na vasculatura coronária, circulação venosa, estroma conjuntivo, etc. . .).

Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente através dos testes Exato de Fischer e U de Mann-Whitney, sob a orientação técnica do Departamento de Bioestatística da UFRGS.

RESULTADOS

A avaliação macroscópica do material de ambos os grupos, incluindo os vários sub-grupos 1, 2, 3, 4 e 5 do grupo A e os do grupo B não mostraram diferenças significativas ($P > 0,05$), sendo consideradas dentro da normalidade para a espécie. A forma, volume, peso médio (0,90 gramas) e características morfológicas foram semelhantes nos dois grupos. Ao corte, estes dados foram confirmados ($P > 0,05$).

Ao estudo microscópico, não houve diferenças significativas quanto às características das fibras estriadas, formação da sincícios, morfologia nuclear, distribuição da cromatina nuclear e morfologia do citoplasma entre animais de diferentes subgrupos do grupo A e grupo B ($P > 0,05$). O interstício apresentava escasso número de fibroblastos, leve congestão vascular, mas estrutura e espessura de paredes venosas e arteriais nor-

mais ($P > 0,05$). As válvulas cardíacas eram constituídas de tecido mesenquimal próprio, revestidas por endotélio normal, contendo coágulos sanguíneos habituais para este tipo de preparação ($P > 0,05$). Nas figuras 2 e 3, podem ser vistas as características descritas em material colhido de animais de ambos os grupos.

O material encaminhado para estudo em microscopia eletrônica se encontra em fase de processamento e será apresentado posteriormente.

DISCUSSÃO

O desenvolvimento de cardiotoxicidade após o uso de drogas antineoplásicas tem sido objeto de grande interesse em literatura^{1 5}. As antraciclina são os derivados em que esta associação tem sido mais bem documentada^{1 6}. Clinicamente dois padrões de toxicidade são descritos. O primeiro é dose-independente, geralmente de instalação aguda, após horas ou dias da injeção da droga, caracterizando-se pelo surgimento de distúrbios de condução e arritmias, ou eventualmente insuficiência cardíaca aguda, com choque cardiogênico^{1 6}. O segundo padrão de toxicidade é cumulativo, dose-dependente e se manifesta por um quadro de insuficiência cardíaca congestiva, geralmente após uma dose total mínima que para a Doxorubicina se situa entre 450-550

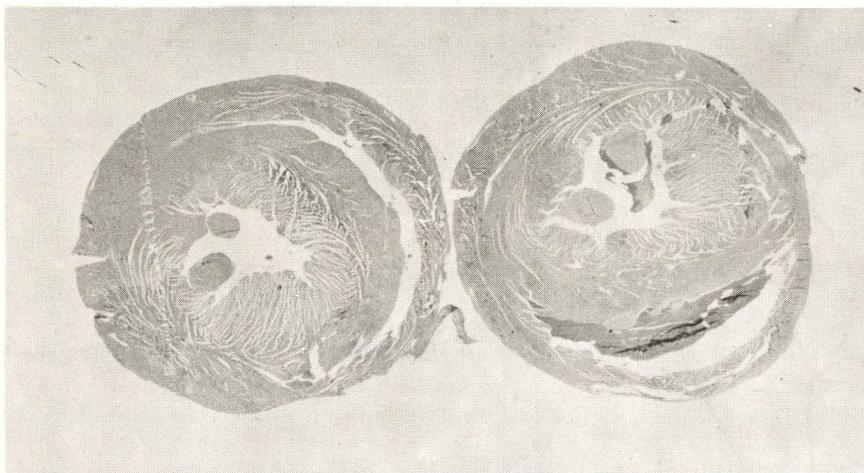
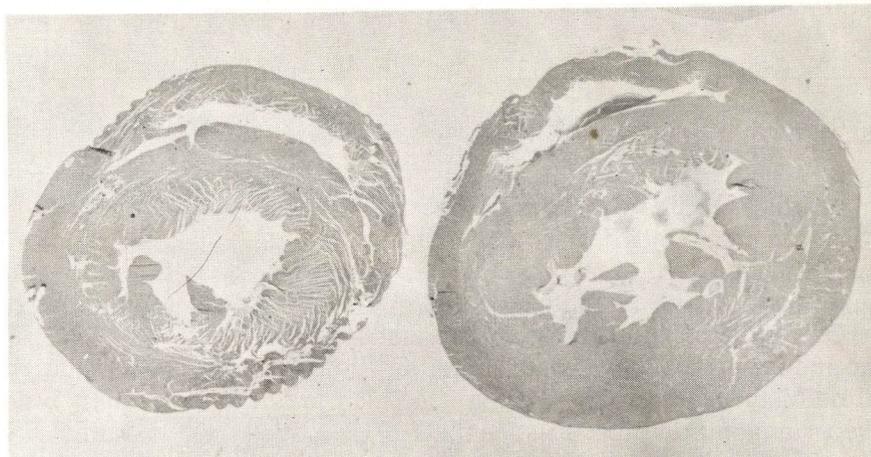


FIGURA 2 — Exemplo de material de coração pré-tratamento.

FIGURA 3 — Exemplo de material de coração pós-tratamento.



mg/m²¹⁶. O diagnóstico desta forma de miocardiopatia é confirmado por biópsia endocárdica, ainda que possa ser detectado através de monitorização de fração de ejeção do ventrículo esquerdo, por método cintilográfico ou ecográfico¹⁶. O mecanismo do dano ao músculo cardíaco é ainda controverso, mas parece estar relacionado a uma excessiva peroxidação de ácidos graxos miocárdicos¹⁷. Neste sentido, estudos utilizando agentes anti-oxidantes, como o alfa-tocoferol, na vigência do uso de Doxorubicina têm sugerido a possibilidade de que estas alterações possam ser prevenidas.

Recentemente, novas antraciclinas têm sido desenvolvidas na tentativa de reduzir a chance de cardiotoxicidade, sem perda da atividade antitumoral.

Entretanto, o risco de dano miocárdico não parece ser uma característica apenas das drogas pertencentes a este grupo. A Mitomicina C pode também se associar ao surgimento de dano cardíaco, sobretudo quando utilizada em protocolos que incluam Doxorubicina²⁰. A Ciclofosfamida pode ocasionar necrose miocárdica aguda após o uso em altas doses (acima de 100mg/kg de peso), o que pode ser demonstrado em pacientes tratados em programas de transplante de medula óssea¹⁶. Além disto, uma síndrome caracterizada por dor torácica, elevação enzimática compatível com infarto do miocárdio tem sido descrita em pacientes tratados com 5-fluorouracil por infusão contínua¹⁶.

O VP-16 é uma droga cujos efeitos colaterais incidem basicamente sobre a medula óssea e o

trato digestivo^{8, 9}. Leucopenia é a principal limitação de seu uso, sendo de grau moderado, com uma queda máxima cerca de 10 dias após a administração endovenosa⁸. As plaquetas tendem a uma queda máxima alguns dias após a depressão dos leucócitos, com recuperação de ambos em cerca de sete dias⁸. Náuseas, vômitos e diarreia podem ocorrer em até cerca de 25% dos casos⁹. Dentre os efeitos colaterais mais raros da droga, cardiotoxicidade tem sido descrita^{1, 2}. Entretanto, isto se fundamenta em relatos de apenas três casos de infarto do miocárdio na vigência da droga e em pacientes com outros fatores de risco cardíaco^{1, 6}. Cardiopatia prévia havia sido descrita em dois destes pacientes e o terceiro havia recebido irradiação de mediatino^{1, 4}.

Tendo como base estas descrições esporádicas vinculando o uso de VP-16 ao surgimento de dado cardíaco, os autores idealizaram este estudo em ratas Albinas. Uma vez que é virtualmente impossível que se conclua quanto aos efeitos colaterais da droga a partir de casos isolados, não-controlados e na vigência de outras drogas ou fatores também passíveis de induzirem dano cardíaco, tornou-se imperativo que se criasse um grupo-controle e que os animais tratados com VP-16 recebessem apenas a droga. Nossos resultados falharam em evidenciar alterações cardíacas significativas pela droga, quer após as injeções iniciais ou oito ciclos semanais. Isto nos permite concluir pela ausência de cardiotoxicidade deste agente, ao menos dentro das condições deste estudo. Isto não exclui a remota possibilidade de que a droga possa induzir espasmo coronariano, não detectável do ponto de vista anatomopatológico. Para elucidar esta dúvida, estudos funcionais, com o uso de drogas vasodilatativas, poderiam ser de utilidade.

Em conclusão, os resultados do presente estudo não confirmam observações de literatura, que atribuem ao VP-16 potencial cardiotóxico. É provável que as alterações descritas a partir de casos isolados decorram de fatores independentes.

SUMMARY

Based on anecdotal reports from the literature suggesting cardiotoxicity due to VP-16, the authors studied the effects on an eight-weekly intraperitoneal (IP) injection of VP-16 in a group of fifty Albino rats, compared to controls receiving isotonic saline during the same period of time. Group A (VP-16) received 5mg/kg weight IP weekly for eight courses. Group B (isotonic saline) had

the same volume in isotonic saline IP. Animals from Group A were killed at two-weekly intervals, according to sub-groups G1, G2, G3, G4 and G5 (10 rats in each interval). Animals from Group B were sacrificed at the end of experiment. Anatomopathological studies of myocardium from Group A failed to show significant differences between subgroups, in spite of increasing total dosis. When both groups were compared, there were no statistical differences between the animals from Group A and B (P less 0.05). The authors conclude that there is no significant cardiac damage during the VP-16 therapy, at least in experimental conditions. The case reports found in the literature suggesting the possibility of cardiac damage due to VP-16 are probably secondary to unrelated factors.

UNITERMS: VP-16, cardiotoxicity.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Arnold, A. M. and Whitehouse, J. M. A.: Etoposide: a new anti-cancer agent. *Lancet*, 1981, 2, 912.
2. Cainer, D. A., Kingston, D. G. I. and Rao, M. M.: High Performance liquid chromatography of podophyllotoxins and related ligands. *J. natural Prod.* 1981, 44, 34.
3. Loike, J. D. and Horwitz, S. B.: Effect of VP-16-213 on the intracellular degradation of DNA in Hela cells. *Biochemistry*. 1976, 15, 5443.
4. Grieder, A., Maurer, R. and Stahelin, H.: Effect of an epipodophyllotoxin derivative (VP-16-213) on macromolecular synthesis and mitosis in mastocytoma cells in vitro. *Cancer Res.* 1974, 34, 1788.
5. Fischer, R. T., DeVita, V. T. Jr., Hubbard, S. M., Longo, D. L., Wesley, R., Chabner, B. A. and Young, R. C.: Diffuse Aggressive Lymphomas: Increased survival after sequences of ProMACE and MoPP chemotherapy. *Annals of Int. Medicine.* 1983, 98: 304-309.
6. Bunn, P. A. Jr., Ihde, D. C.: Small-cell bronchogenic carcinoma: A review of therapeutic results. In Livingston R. B. (ed): *Lung Cancer: Advances in Research and Treatment* vol. 1: 169-208. The Hague, Martinus Nijhoff. 1981.
7. Williams, S. D. and Einhort, L. H.: VP-16-213 salvage therapy for refractory germinal neoplasms. *Cancer*. 1979, 44: 1514-1516.
8. Macbeth, F. R.: VM-26: Phase I and II studies. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*. 1982, 7, 87.
9. Brunner, K. W., Sontag, R. W., Ryssel, H. J. and Cavalli, F.: Comparison of the biologic activity of VP-16-213 given i.v. and orally in capsules or drink ampules. *Cancer Treatm. Rep.* 1976, 60, 1377.
10. Issel, B.: The podophyllotoxin derivatives VP-16 and VM-26. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1982, 7, 73.
11. Van Echo, D. A., Wiernick, P. H. and Aisnes, J.: High-dose VP-16-213 (NSC-141540) for the treatment of patients with previously treated acute leukemia. *Cancer Clin. Trials.* 1980, 3, 325.
12. D'Incalci, M. and Garattini, S.: Podophyllin derivatives VP-16 and VM-26: In the *Cancer Pharmacology Annual*, Chabner, B. A. and Pinedo, H. M. (ed.); Excerpta Medica, Amsterdam, 6: 91. 1983.
13. Aisner, J., Van Echo, D. A., Whitacre, M. and Wiernis, P. H.: A phase I trial of continuous infusion VP-16-213 (etoposide). *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, 7, 157. 1982.
14. Schechter, J. P., Jones, S. E. and Jackson, R. A.: Myocardial infarction in a 27 year-old woman: possible complication of treatment with VP-16-213 (NSC-141540), mediastinal irradiation, or both. *Cancer Treatm. Rep.* 1975, 59, 887.
15. Bonnadona, G. and Monfardini, S.: Cardiotoxicity of Daunorubicin. *Lancet*. 1969. 1: 837.

16. Chabner, B. A. and Myers, C. E.: Clinical Pharmacology of Cancer Chemotherapy. In Cancer: Principles and Practice of Oncology, DeVita, V. T. Jr., Hellman, S. and Rosenberg, S. A. (Ed.), 9: 182. 1982.
17. Dantchev, D., Slioussantchouk, V., Paintrand, M. et al.: Eletron microscopy studies of the hearth and light microscopie studies of golden hamsters with Adriamycin, Daunomycin, AD 32 and aclaconomycin. Cancer Treatment Reports. 1979, 63:875-888.
18. Myers, C. E., Liss, R. H., Ifrim, I., Grotzinger, K. and Young, R. C.: Adriamycin: The role of lipid peroxidation in Cardiac toxicity and tumor response. Science. 1977. 197, 165.
19. Salmon, S. E., Liu, R. M. and Casazza, A. M.: Evaluation of new anthracycline analogs with the human stem cell assay. Cancer Chemotherapy Pharmacology. 1981, 6, 103.
20. Crooke, S. T., Bradner, W. T.: Mitomycin C: A review. Cancer Treatment Review. 1978, 3: 121-139.