CORRELAÇÃO ENTRE PROCESSO INFLAMATÓRIO PÓS ISQUEMIA E REPERFUSÃO DE AORTA INFRARRENAL INDUZIDO EM RATOS WISTAR E DESENVOLVIMENTO DE SEPSE

Luana Lopes (BIC/FA), Filipe da Silva Linhares, Rafael Inácio Brandão, Katia Sabrina Paludo (Orientador), e-mail: katiapaludo@gmail.com

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética.

2.06.00.00-3 Morfologia, 2.06.01.00-0 Citologia e Biologia Celular.

Palavras-chave: Sepse, lesão renal aguda, lesão hepática

Resumo

A sepse é uma disfunção orgânica com risco de vida decorrente de uma resposta do organismo frente a um processo infeccioso. Baseia-se na liberação de citocinas pró-inflamatórias frente a existência de endotoxinas no organismo, que geram alterações sistêmicas. O objetivo desse projeto foi determinar se há alterações histológicas e sorológicas sistêmicas após o processo de isquemia e reperfusão (I/R) de aorta infrarrenal compatíveis com a sepse. Foram utilizados 25 ratos Wistar distribuídos em 5 grupos: controle (SHAM), Reperfusão única (RU), Alopurinol e Reperfusão única (ARU), Reperfusão repetida (RR) e Alopurinol e Reperfusão repetida (ARR). Cada grupo recebeu tratamento pré e pós cirúrgico conforme sua nomenclatura. Como resultados obtivemos que o grupo RU apresentou maiores níveis sorológicos e alterações histológicas que o grupo SHAM. Os grupos condicionados com RR apresentaram redução dos parâmetros em relação ao grupo RU. O grupo ARU não apresentou alterações em relação aos controles. Concluímos que os animais que passaram pelo processo I/R apresentaram processo séptico, que o condicionamento com reperfusão repetida foi protetor e o alopurinol não se mostrou efetivo.

Introdução

A sepse é definida como uma disfunção orgânica com risco de vida decorrente de uma resposta desregulada do organismo frente a uma infecção. Baseia-se no fato da liberação exacerbada de citocinas pró-inflamatórias frente a existência e migração vascular de patógenos e endotoxinas no organismo que, se não controlada pode evoluir para Síndrome da Disfunção de Múltiplos Órgãos (SDMO). Essa reação do organismo pode ocasionar lesão a diversos órgãos, como: dano isquêmico tubular renal, edema intersticial pulmonar e congestão com isquemia hepática (AZEVEDO et al., 2018).

A isquemia tem papel fundamental em muitas situações clínicas perioperatórias, porém traz diversos malefícios aos tecidos acometidos (KUMAR ET AL, 2010). A reperfusão, passo lógico para lidar com qualquer situação de isquemia, contraditoriamente, é a grande responsável pelas principais lesões nas células do órgão alvo e pode agravar o dano celular isquêmico levando a complicações sistêmicas como disfunções renais, hepáticas e ocasionalmente, até ao cenário da SDMO (FERRO et al., 2010; MIRANDA et al., 2004). O objetivo deste estudo foi relacionar os resultados histológicos e sorológicos sistêmicos obtidos pelo processo de isquemia e reperfusão de aorta infrarrenal em ratos da raça Wistar com as alterações causadas pelo possível desenvolvimento de sepse.

Material e Métodos

Propomos a utilização de duas abordagens para evitar ou reduzir os efeitos deletérios secundários à I/R nos ratos submetidos a isquemia de membros inferiores por clampeamento da aorta infrarrenal. Realizamos o pré-tratamento de um grupo de animais com 100 mg/kg do antioxidante alopurinol (1 h antes da isquemia, ARU). Outro grupo recebeu, imediatamente antes da reperfusão final, três ciclos de 2 minutos de isquemia e reperfusão, técnica conhecida como pós-condicionamento (reperfusão repetida, RR). Um terceiro grupo recebeu uma combinação das 2 abordagens (ARR). Como grupos controle tivemos animais submetidos a isquemia e reperfusão única (grupo controle positivo, RU) e animais submetidos ao procedimento cirúrgico, mas sem a aplicação da isquemia (grupo SHAM). Após 72 h os animais foram submetidos a anestesia profunda, exsanguinados por punção na carótida e coleta do fígado e dos rins. Com o sangue foram realizados ensaios para mensuração de enzimas hepáticas, creatinina e lactato.

O fígado e os rins, foram armazenados em fixador ALFAC por 16 h e submersos em etanol 70% até o início do processamento histológico, de acordo com técnica histológica convencional.

Resultados e Discussão

Nos resultados bioquímicos pudemos observar que em relação à dosagem de creatinina obtivemos um aumento dos níveis no grupo RU comparado ao grupo SHAM, e uma diminuição significativa nos grupos que receberam os condicionamentos (RR e ARR) comparados ao grupo RU (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de AST, ALT, creatinina e lactato.

Grupo	TGO	TGP	Creatinina	Lactato
SHAM	43 ± 4,68 *	154,7 ± 29,02 *	0,52 ± 0,017 *	18 ± 0,55*
RU	91 ± 23, 21	426,8 ± 180,2	0,61 ± 0,01	42 ± 1,82
ARU	43,8 ± 7,06 *	148 ± 31,05 *	0,54 ± 0,02	39,8 ± 4,28
RR	42,4 ± 1,99 *	150,8 ± 22,36 *	0,51 ± 0,014 *	22,4 ± 2,87*
ARR	44,6 ± 0,81 *	171,8 ± 24,82 *	0,50 ± 0,03 *	21,8 ± 3,45*

O sangue dos animais foi coletado 72 horas após a realização do procedimento cirúrgico. Média ± o erro padrão da média, n = 5 - 7. Anova de uma via e pós-teste de Tukey. *p<0,05 em relação ao grupo reperfusão única (RU).

O grupo RU apresentou um aumento dos níveis de creatinina, o que representa uma alteração na função renal. Por outro lado, os grupos ARU e RR e ARR níveis séricos de creatinina próximos do fisiológico. A creatinina é um resíduo metabólico filtrado livremente pelos glomérulos, sem que ocorra reabsorção significativa e por isso é utilizada na mensuração da função renal. Alterações renais devido ao quadro séptico cursam com aumento dos níveis de creatinina, sugerindo lesão renal inflamatória e redução da perfusão renal (TIETZ *et al*, 2006).

Em relação aos níveis de lactato observamos que o grupo ARU não apresentou elevação dos níveis séricos de lactato acima do normal. Já o grupo de RU apresentou elevação até o valor limítrofe de 45 mg/dL, o que foi estatisticamente significativo em relação ao SHAM. Os grupos ARR e RR apresentaram redução dos níveis de lactato em relação ao RU (Tabela 1). O lactato é um resíduo decorrente da depleção das reservas celulares de ATP, sua produção é aumentada frente a processos de estresse, como infecções e isquemia e sua elevação corrobora para a caracterização do processo séptico e aponta para a evolução de um choque com ameaça a vida.

A lesão hepática pode ser avaliada pelos níveis das enzimas hepáticas TGP e TGO, que acima do normal, indicam algum nível de dano hepático e são consideradas

os marcadores mais sensíveis da lesão hepática (GIANNINI *et al.*, 2005). Segundo Melo *et al* (2012) os níveis séricos de TGO e TGP para ratos considerados normais são, respectivamente, entre 83 a 184 U/L e 26 - 60 U/L. Em nosso estudo observamos que o grupo SHAM apresentou níveis de TGO de 180 U/L e o grupo RU apresentou um aumento significativo dos mesmos (600 U/L), enquanto que os grupos condicionados também ficaram dentro da normalidade apresentando melhora em relação ao grupo RU (Tabela 1). Em relação aos níveis de TGP observamos o mesmo ocorrido, em que o grupo RU apresentou níveis de 120 U/L, significadamente maior que o SHAM (50 U/L) e os demais grupos que ficaram dentro da faixa fisiológica.

Em relação à histologia renal, o grupo SHAM apresentou histologia normal. Nos animais do grupo RU pôde-se evidenciar alterações no ápice das células tubulares e necrose das mesmas. Além disso, o grupo RR obteve uma maior frequência de necrose, ao passo que o grupo ARU apresentou uma redução significativa em relação ao mesmo. Levando-se em conta a alteração do ápice das células tubulares percebe-se que o grupo RU apresentou um aumento dessa alteração em relação ao grupo SHAM, demonstrando que o processo de I/R causou danos ao tecido renal. O grupo ARU apresentou uma redução significativa da alteração comparado ao RU. A congestão glomerular encontrou-se presente nos grupos RR, ARU e ARR, onde os grupos RR e ARR apresentaram resultado significativo em relação ao grupo RU. Analisando a dilatação dos túbulos renais foi evidenciado que os grupos SHAM e RU não apresentaram tal alteração, ao passo que os grupos RR, ARU e ARR apresentaram e todos foram significativos comparados ao grupo RU (tabela 2).

TABELA 2 - Medianas das alterações histológicas renais em cada grupo.

GRUPOS	SHAM	RU	ARU	RR	ARR
Alterações histológicas	Mediana das alterações histológicas renais encontradas				
Dilatação dos túbulos renais	0	0	1,5*	2,5*	2*
Alteração do ápice das células tubulares	0	3 #	1*	3	1,5
Congestão Glomerular	0	0	1	2*	1,5*
Necrose de células tubulares	1	3 #	1*	3	1,5

ANOVA e Teste de Fisher. *p<0,05, comparado com o grupo Reperfusão única; #p<0,05, comparado com o grupo SHAM. Mediana dos grupos que apresentam de 5 a 7 animais.

As alterações morfológicas que predizem a necrose isquêmica de células tubulares renais começam a aparecer após 30 min de isquemia e mais de uma hora de reperfusão (KUMAR, 2010). Ainda assim, muitas vezes as células lesionadas conseguem sobreviver, pois podem apresentar alterações subletais, como degeneração hidrotópica ou vacuolar com modificações discretas. Porém quando ocorre a reperfusão as lesões são exacerbadas pelo aporte de oxigênio, formando as espécies reativas de oxigênio (EROs), está associada à intensa participação de neutrófilos, que ampliam a resposta inflamatória e, portanto, a lesão renal (FEITOSA *et al*, 2005). Este fato é confirmado por nosso modelo, uma vez que os animais do grupo RU obtiveram lesões com resultados estatisticamente significativos sobre os animais do grupo SHAM.

Segundo Suzuki et al (1993) as alterações patológicas que podem ser encontradas em tecido hepático ocasionadas por EROs, liberados em resposta a sepse são: vacuolização, congestão e necrose. Conforme a Tabela 3 podemos observar que em relação a presença de vacuolização, o grupo RU apresentou valores maiores que o grupo SHAM, o que demonstra lesão hepática indireta pelo processo de I/R de aorta abdominal em ratos. E neste mesmo parâmetro os grupos RR e ARR apresentaram menos vacuolização que o grupo RU.

TABELA 3 - Medianas das alterações histológicas hepáticas por grupo.

GRUPOS	SHAM	RU	ARU	RR	ARR
Alterações histológicas	Mediana das alterações histológicas hepáticas encontradas				
Vacuolização	1	3#	1	2,5*	1*
Necrose celular	0	0	0	0	0
Congestão Glomerular	0	1#	1	1	1

ANOVA e Teste de Fisher. *p<0,05, comparado com o grupo Reperfusão única; #p<0,05, comparado com o grupo SHAM. Cada linha apresenta a mediana dos grupos que apresentam de 5 a 7 animais.

O processo de congestão ocorre pela vasodilatação dos vasos hepáticos e o acúmulo de hemácias frente a um processo de lesão celular (DIDONE et al, 2002). No nosso estudo, podemos observar que o grupo RU apresentou congestão significante frente ao grupo SHAM, o que confirma que o nosso modelo induz alterações importantes em órgãos distantes da isquemia, mas nenhuma das abordagens empregadas reduziu estatisticamente a lesão nesse parâmetro. Em relação a necrose não obtivemos resultados significativos, nem mesmo para o grupo SHAM e RU.

Conclusões

Os animais que sofreram o processo de isquemia e reperfusão de aorta abdominal apresentaram lesões hepáticas, renais e sistêmicas que indicam a presença de processo séptico. Os grupos tratados com reperfusão fracionada apresentaram redução dos parâmetros avaliados quando comparados aos outros grupos, o que demonstra um potencial protetor dessa abordagem. O pré-tratamento com alopurinol não reduziu nenhum dos parâmetros analisados.

Agradecimentos

Agradeço a Fundação Araucária pela bolsa de iniciação científica e a professora Katia pela paciência de sempre e oportunidade.

Referências

AZEVEDO, L.C.P.; TANIGUCHI, L.U.; LADEIRA, J.P. **Medicina intensiva: abordagem prática.** 3 ed. São Paulo: Editora Manole, 2018.

DIDONÉ, E.C.; CERSKI, C.T.; KALIL, A.N. N-acetilcisteína diminui a congestão hepática na lesão de isquemia e reperfusão - estudo experimental. Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgia. 29: 191-196, 2002.

FEITOSA , E.A.N. et al. Estudo da Morfologia Renal. **Rev. Col. Bras. Cir.** 32:4 10-17, 2005.

FERRO, C. O.; CHAGAS. V. L. A.; OLIVEIRA, M. F.; OLIVEIRA, P. L.; SCHNAIDER, A. Atividade da catalase no pulmão, rim e intestino delgado não isquemiado de ratos após reperfusão intestinal. **Rev Col Bras Cirur**. 37:31-38, 2010.

GIANNII, E. G.; TESTA, R.; SAVARINO, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. CMAJ. 172: 367-379, 2005.

KUMAR, V.; et al. **Patologia: Bases patológicas das doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 11-25, 2010.

MIRANDA, L. E. C. et al. As bases experimentais da lesão por isquemia e reperfusão do fígado. Revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**. 19: 3 -12, 2004.

SUZUKI, S.; TOLEDO-PEREYRA, L.H.; RODRIGUEZ, F.J. Neutrophil infiltration as an important factor in liver eschemia and reperfusion injury. Transplantation. 55: 1265-1272, 1993.

TIETZ, N.W.; BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.D. Tietz textbook of Clinical chemistry and molecular diagnostics. **St. Louis: Elsevier Saunders**. 4: 679-706, 2006.