AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES PULMONARES AO LONGO DO TEMPO EM UM MODELO DE TRAUMA/CHOQUE HEMORRÁGICO EM RATOS

Luana Bojko (PIBIC/CNPq)[1], José Rosa Gomes[2], Daniel Fernandes[3], Regina de Sordi (Orientadora)[4], rsordi@uepg.br

[1]Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)/Acadêmica do Curso de Farmácia.
[2] UEPG/Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética.
[3] Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)/Departamento de Farmacologia.
[4] UEPG/Departamento de Ciências Farmacêuticas.

Ciências biológicas: Farmacologia cardiorenal

Palavras-chave: choque hipovolêmico, disfunção de múltiplos órgãos, metaloproteinases de matriz, doxiciclina.

Resumo

O choque hemorrágico (CH) se caracteriza pela insuficiência circulatória aguda e má perfusão tecidual. As metaloproteinases de matriz (MMPs) podem estar envolvidas em diferentes processos patológicos, incluindo o CH. O objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações pulmonares em um modelo de trauma associado ao CH e o papel das MMPs neste processo. O modelo de CH foi realizado e imediatamente antes da reperfusão administrou-se nos animais veículo ou doxiciclina (DOX; 10 mg/kg; inibidor de MMPs). Os pulmões foram coletados para a análise histológica e ensaio da enzima mieloperoxidade 4 e 24 h após a cirurgia. Observou-se um processo inflamatório significativo após a hemorragia e ressuscitação, o qual foi definido a partir da análise histológica como severo para o grupo CH 4h e leve para CH 24h. O tratamento com a DOX diminuiu a extensão da inflamação no grupo CH 24h. Nossos dados sugerem uma possível participação das MMPs no dano pulmonar associado ao modelo de CH.

Introdução

O trauma é uma importante causa de morte, com aproximadamente 5 milhões de vítimas por ano no mundo (WHO, 2004); cerca de 40% das mortes são devido à hemorragia grave e evolução do quadro para o choque hemorrágico (CH) (SCHREIBER, 2005). O CH é definido pela redução aguda no volume sanguíneo, resultando na perfusão tecidual inadequada e desequilíbrio entre a demanda e o consumo de oxigênio, o que leva a hipóxia tecidual e desarranjo do processo bioquímico a nível celular (DEWAR et al., 2009). O CH caracteriza-se por duas fases: (a) compensatória, na qual o organismo tenta manter a pressão arterial através da liberação de vasoconstritores endógenos e (b) descompensatória, onde ocorre uma progressiva vasodilatação após a hiporreatividade aos agentes vasoconstritores (BOND; JOHNSON, 1985). A descompensação vascular causa hipoperfusão de órgãos periféricos podendo levar ao desenvolvimento da falência de múltiplos órgãos (FMO) (SCHREIBER, 2005). Além disso, embora a reposição volêmica seja necessária para restaurar a perfusão tecidual, sabe-se que ela também está associada a uma exacerbação do dano de órgãos e uma profunda resposta inflamatória sistêmica (ELTZSCHIG; ECKLE, 2011). Os principais sistemas

acometidos neste processo são: cardiovascular, pulmonar, hepático e renal (DEWAR et al., 2009). Como a FMO ocorre de forma degenerativa e progressiva, é de se esperar que algumas metaloproteinases de matriz (MMPs) contribuam para o desenvolvimento desse processo. Atualmente não existe tratamento específico para essa condição associada ao CH, apenas algumas medidas de suporte. Neste sentido, a doxiciclina (DOX) pode ser uma alternativa terapêutica para diminuir a lesão tecidual isquêmica, pois atua inibindo a atividade das MMPs. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações pulmonares que ocorrem ao longo do tempo em um modelo de trauma associado ao CH induzido em ratos e investigar a possível participação das MMPs neste processo.

Materiais e Métodos

Indução do trauma associado ao choque hemorrágico

Os procedimentos foram aprovados pela CEUA/UEPG (nº 048/2015). O sangue dos ratos foi retirado até uma pressão arterial média de 35 mmHg, a qual foi mantida por 90 min. Os animais foram randomizados, receberam veículo (salina, 1 mL/kg) ou doxiciclina (DOX, fármaco inibidor de MMPs; 10 mg/mL/kg) e foram reperfundidos com o sangue. Aqueles que receberam veículo foram sacrificados 4 ou 24h após a cirurgia e os que receberam DOX, foram avaliados apenas após 24h. O sangue e pulmões foram coletados para o ensaio da enzima mieloperoxidase (MPO) e análise histológica. Animais *sham* (falso-operados) foram utilizados como controle, sendo submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, porém sem a retirada de sangue.

Determinação da enzima mieloperoxidase (MPO) e análise histológica em pulmão

A atividade da enzima MPO foi determinada como descrito em trabalhos prévios (MULLANE; KRAEMER; SMITH, 1985) e o resultado final apresentado como unidades de densidade óptica (D.O.)/mg de proteína. Para análise histológica, o pulmão esquerdo foi desidratado, incluído na parafina e seccionado em cortes transversais (7 µm); depois corado com hematoxilina-eosina e analisado às cegas por dois pesquisadores através de microscópio de luz. A extensão do processo inflamatório foi avaliada de maneira semi-quantitativa (BECK et al., 2001) de acordo com este escore: (0) ausência de inflamação ou apenas células inflamatórias ao redor de pequenos vasos; (1) inflamação leve (infiltrado inflamatório em até 25% da área total do corte); (2) inflamação moderada (infiltrado inflamatório em > 25% ou < 50% da área total do corte) e (3) inflamação severa (infiltrado inflamatório em > 50% da área total do corte).

Resultados e Discussão

Após a retirada do sangue para simular a hemorragia, a pressão arterial média (PAM) do grupo choque manteve-se em 35 ± 2 mmHg durante uma hora e meia. Depois da reperfusão, atingiu valores mais elevados, porém ainda inferiores ao grupo controle (*sham*). A PAM basal do grupo CH só voltou aos valores normais após 24h (figura 1A). A atividade da enzima MPO demonstrou-se aumentada nos pulmões dos animais submetidos ao CH (figura 1B), quando comparado ao grupo *sham* (barra aberta), sugerindo indiretamente que houve o recrutamento de neutrófilos para o tecido. Esse aumento não foi diferente entre os grupos CH 4 e 24h. Além disso, o tratamento com

DOX não reduziu os níveis de MPO (figura 1C), quando comparado ao grupo CH veículo 24h.

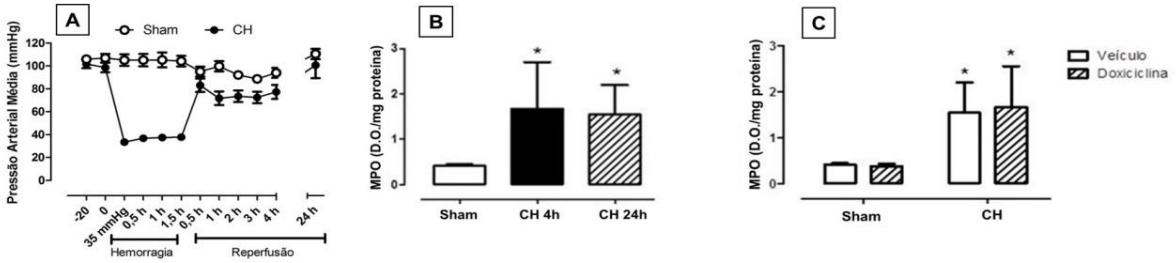


Figura 1 - **Painel (A):** Variação da pressão arterial ao longo do tempo em um modelo de trauma associado ao CH seguido de ressuscitação. **Painel (B):** Estudo temporal da atividade da MPO pulmonar de animais submetidos ao modelo de CH. **Painel (C):** Efeito do tratamento com a DOX na atividade da MPO pulmonar de animais submetidos ao modelo de CH. Cada barra (painéis B e C) representa a média ± erro padrão da média de 8 animais. *p < 0,05 em relação ao grupo *sham* (ANOVA de uma via seguida pelo post hoc de Dunnett (painel A) e ANOVA de duas vias seguida pelo post hoc do Bonferroni (painel B)). CH = choque hemorrágico; *Sham* = falso-operado.

A avaliação histológica mostrou que os ratos controle não apresentaram infiltrado inflamatório pulmonar significativo (figura 2/A1), alguns apenas manifestaram poucas células inflamatórias ao redor de pequenos vasos (setas). Por outro lado, os grupos CH 4 e 24h desenvolveram um processo inflamatório predominantemente severo (figura 2/A2) e leve (figura 2/A3), respectivamente, sugerindo que a reação inflamatória após o CH é mais intensa a curto prazo. O menor escore patológico após 24h pode ter ocorrido pois o processo inflamatório começa a se resolver ou também porque os animais não desenvolveram uma FMO muito grave. Além disso, as diferenças interindividuais podem interferir no desenvolvimento da doença.

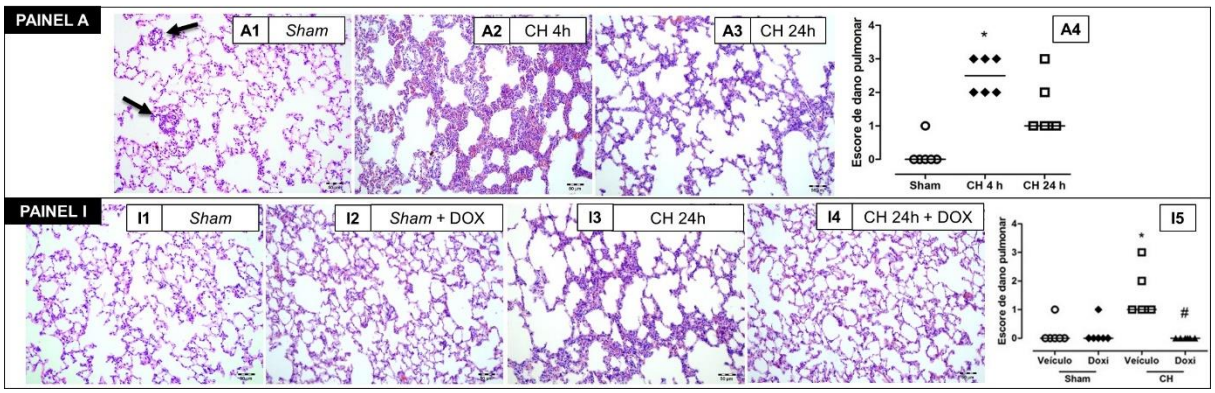


Figura 2 - Histologia e escore patológico dos pulmões dos animais submetidos ao CH. **Painel (A):** Avaliação do dano pulmonar após 4 e 24 h da indução do CH. **Painel (B):** Efeito do tratamento com a DOX na extensão do processo inflamatório pulmonar de animais submetidos ao CH. * p < 0,05 em relação aos grupos *sham e* # p < 0,05 em relação ao grupo choque veículo (CH 24h), (teste de Kruskal-Wallis seguido pelo post hoc de Dunn). CH = choque hemorrágico; DOX = doxiciclina.

Os animais CH 24h apresentaram processo inflamatório significativo (figura 2/I3) quando comparado ao grupo *sham* (figura 2/I1 e I5). O tratamento dos animais CH com a DOX foi capaz de reduzir o dano pulmonar associado a esta condição (figura 2/I4). Por outro lado, o tratamento dos animais *sham* com DOX (figura 2/I2) não apresentou nenhuma alteração quando comparado ao grupo veículo (figura 2/I1). Não sabemos exatamente o que levou à diferença encontrada entre os resultados da MPO e a análise histológica, já que ambos levam em conta o processo inflamatório.

Entretanto, a enzima MPO é um marcador indireto e menos preciso do recrutamento de neutrófilos para o tecido (MULLANE; KRAEMER; SMITH, 1985) e como não foi realizada a perfusão dos animais antes do experimento, pode ter sofrido interferência da presença de neutrófilos do sangue. Além disso, devido a menor precisão, é difícil estimar qual a magnitude da redução do número de neutrófilos necessária para ser possível a detecção pelo método. Em contrapartida, a análise histológica é um método mais preciso pois é possível estimar o número de neutrófilos por campo analisado. Entretanto, o infiltrado inflamatório pode conter outras células que não foram diferenciadas de neutrófilos, por exemplo células mononucleares tais como macrófagos alveolares e macrófagos circulantes (AL-AMRAN; HADI; HASHIM, 2013).

Conclusões

O acúmulo de células inflamatórias no pulmão foi mais intenso no início do processo, isto é, 4h após o CH. O tratamento dos animais submetidos ao CH com DOX foi capaz de reduzir a extensão da inflamação pulmonar, sugerindo que as MMPs podem desempenhar um papel relevante nesse processo. Portanto, a utilização de fármacos inibidores dessas proteases pode ser uma alternativa terapêutica para diminuir a lesão tecidual isquêmica que ocorre durante a FMO associada ao CH.

Agradecimentos

Ao CNPq e à CAPES pelo suporte financeiro. Aos professores Dr. Daniel Fernandes e Dr. José Rosa Gomes por cederem seus laboratórios e equipamentos.

Referências

AL-AMRAN, F. G.; HADI, N. R.; HASHIM, A. M. Cysteinyl leukotriene receptor antagonist montelukast ameliorates acute lung injury following haemorrhagic shock in rats. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, v. 43, p. 421-427, 2013.

BECK, M. A. et al. Selenium deficiency increases the pathology of an influenza virus infection. **The FASEB Journal**, v. 15, n. 8, p. 1481-1502, jun. 2001.

BOND, R. F.; JOHNSON G. Vascular adrenergic interactions during hemorrhagic shock. **Federation proceedings**, v. 44, n. 2, p. 281-289, 1985.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem,** v. 72, p. 248-254, 1976.

ELTZSCHIG H. K.; ECKLE, T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. **Nature Medicine**, v. 17, n. 11, p.1391-1401, 2011.

FÜLÖP, A. et al. Experimental Models of Hemorrhagic Shock: A Review. **European Surgical Research**, v. 50, p. 57-70, abr. 2013.

DEWAR, D. et al. Postinjury multiple organ failure. **International Journal of the Care of the Injured**, v. 40, n. 9, p. 912-918, 2009.

MULLANE, K. M.; KRAEMER, R.; SMITH, B. Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. **Journal of Pharmacological Methods**, v. 14, n. 3, p. 157-167, 1985.

SCHREIBER, M. A. Coagulopathy in the trauma patient. **Current Opinion in Critical Care**, v. 11, p. 590-597, 2005.

WHO (World Health Organisation). Global Burden of Disease Report, 2004.