ESTUDO TEMPORAL DO DANO HEPÁTICO ASSOCIADO A UM MODELO DE TRAUMA / CHOQUE HEMORRÁGICO EM RATOS.

Lucas Wenceslau Moreno (PIBIC/UEPG)[1], Luana Bojko[1], José Rosa Gomes[2], Daniel Fernandes[3], Regina de Sordi[1] (Orientadora), e-mail: rsordi@uepg.br.

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

Área: Ciências biológicas e subárea: Farmacologia Cardiorenal.

Palavras-chave: choque hipovolêmico, falência de múltiplos órgãos, figado

Resumo

O choque hemorrágico (CH) ou hipovolêmico pode ocorrer como resultado de hemorragia grave secundária a um trauma tecidual. O CH está associado com o desenvolvimento de falência de múltiplos órgãos, sendo que o fígado é um dos orgãos mais fequentemente acomedido por esta condição. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi investigar as alterações hepáticas ao longo do tempo em um modelo de trauma associado ao CH. Foram realizadas as dosagens plasmáticas de marcadores de dano hepático (AST e ALT), a avaliação do tecido hepático atrás de cortes histológicos e a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).

.

Introdução

O choque hemorrágico (CH) pode ocorrer após uma hemorragia grave secundária a um trauma tecidual, é caracterizada por 2 fases: uma fase compensatória e uma fase descompensatória que pode levar a morte do paciente (BOND & JOHNSON, 1985). A descompensação vascular associada ao CH pode levar a falência de múltiplos órgãos (FMO) (SCHREIBER, 2005; PFERFER et al., 2009).
A FMO ocorre geralmente dentro de dois dias após admissão hospitalar e correlaciona-se com aumento de infecções nosocomiais (MINEI et al., 2012). Por outro lado, a restauração do fluxo sanguíneo e a reoxigenação que ocorre durante a reposição volêmica, embora seja necessária, é associada com um aumento do dano de órgãos e uma grande reposta inflamatória sistêmica (ELTZSCHIG & ECKLE, 2011).
Um dos principais sistemas acometidos neste processo é o hepático, e o objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações no tecido hepático que ocorrem ao longo do tempo em um modelo de trauma associado ao choque hemorrágico.

Materiais e Métodos

Indução do trauma associado ao choque hemorrágico

Os ratos foram anestesiados e a artéria femoral foi localizada e dissecada para inserção de uma cânula de polietileno, sendo que essa via foi utilizada para duas

finalidades: (1) registro da pressão arterial do animal média (PAM) e frequência cardíaca; e (2) retirada do sangue do animal até que este atinja uma pressão arterial média de 35 ± 2 mmHg. Então, a veia femoral também foi localizada e dissecada para inserção de uma cânula de polietileno para a posterior administração do sangue retirado do animal, fluidos e drogas. A PAM do animal foi mantida em 35 ± 2 mmHg por 90 minutos e então foi realizada a ressuscitação do animal com o sangue restante. As cânulas foram então retiradas, os vasos ligados e a pele na região da coxa foi suturada. Quatro e 24 h após a cirurgia o sangue e o fígado dos animais foram obtidos e analisados como indicado abaixo.

Dosagem das enzimas aspartato transaminase (AST) e a alanina aminotransferase (ALT)

O sangue dos animais foi obtido e centrifugado a 3000 g por 10 min para obtenção do plasma. As enzimas AST e ALT foram mensuradas através do analisador bioquímico Respons 920 DiaSys®.

Avaliação do tecido hepático através de corte histológico

Os fígados dos animais foram localizados, retirados e fixados. Os fígados foram desidratados e incluídos na parafina para realizar os cortes transversais de 5 µm com o auxílio de um micrótomo. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e analisados em microscópio de luz (Leica Microsystems DMI 3000B, Alemanha). Os cortes foram analisados em óleo de imersão no aumento de 1000x, observando-se 10 campos aleatórios de cada animal. Em cada campo foi contabilizada a quantidade de células polimorfonucleares presentes e depois os resultados obtidos foram comparados entre os diferentes grupos.

Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

Os animais foram sacrificados e os fígados coletados e congelados. Posteriormente, os órgãos foram homogeneizados e centrifugados e o sobrenadante utilizado para o ensaio de determinação da atividade da enzima MPO. A reação enzimática foi desenvolvida na presença de tetrametilbenzidina (1,6 mM) e H_2O_2 0,5 mM (em solução tampão fosfato 80 mM; p 5,4) A quantidade de proteína total foi estimada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) e o resultado foi expresso como DO/mg de proteína.

Resultados e Discussão

No interior das células do fígado são encontradas algumas enzimas chamadas de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) que podem ser consideradas como marcadores de dano hepático quando presentes no plasma. Nos animais submetidos ao CH foi possível observar o aumento destes marcadores quando comparado ao sham caracterizando dano hepático (figura 1A e B). Este aumento ocorreu já no tempo de 4 h após o choque e persistiu por pelo menos 24 h.

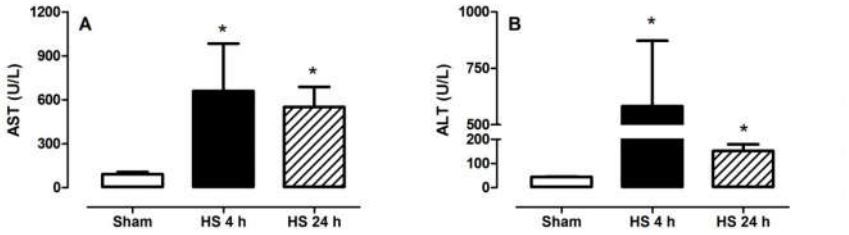


Figura 1. Marcadores de dano hepático. Os animais foram sacrificados e então o sangue foi coletado para a determinação das enzimas AST (painel A) e ALT (painel B). As barras representam a média ± erro padrão da média, n = 8. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida pelo post hoc de Dunnett's. *p<0,05 em relação ao grupo sham.

Foi então avaliada a atividade da enzima MPO no fígado dos animais, a qual é utilizada como um marcador indireto da presença de neutrófilos no tecido. Conforme podemos observar na figura 2, houve uma redução da atividade da MPO no grupo CH 4 h quando comparado ao grupo sham, e o grupo 24 h ficou semelhante ao grupo sham. Este dado foi um tanto intrigante, pois no modelo de CH, espera-se o aumento do processo inflamatório, e não a sua redução. Como a determinação da MPO é um método indireto da presença de neutrófilos no tecido, e está sujeito a interferentes, como o próprio sangue periférico, resolvemos analisar o processo inflamatório através de cortes histológicos, o qual é um método mais preciso.

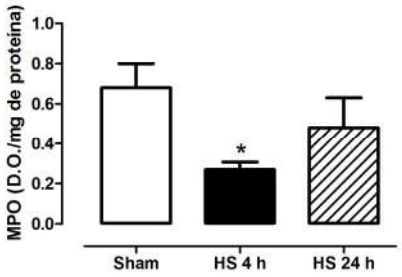


Figura 2. Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase no fígado. A MPO foi determinada em biopsias do tecido do fígado 4h e 24 h após a indução do CH. *p<0,05 em relação ao sham.

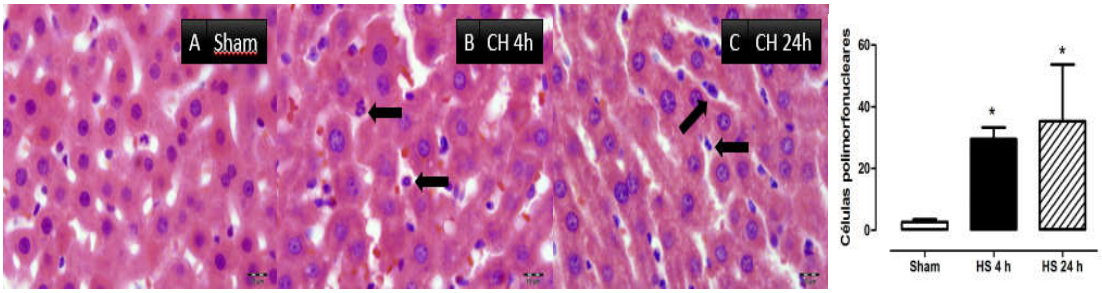


Figura 3. Contagem de células polimorfonucleares. Os cortes foram analisados no aumento de 1000x em óleo de imersão e contados os neutrófilos em 10 campos aleatórios de cada animal. É possível observar na imagem B e C a presença de neutrófilos apontadas por setas pretas. *p<0,05 em relação ao sham.

Quando analisamos os cortes histológicos do fígado, observamos um aumento de células polimorfonucleares nos animais CH quando comparado ao sham, em que foi visto apenas algumas células polimorfonucleares que pode ser considerado o

normal do tecido (figura 3). Podemos observar que houve um recrutamento de neutrófilos caracterizando um processo inflamatório agudo que persistiu por pelo menos 24h depois do choque.

Conclusões

Podemos concluir queo modelo de CH causou dano hepático nos animais, o qual foi associado a um recrutamento de neutrófilos caracterizando uma inflamação aguda que persistiu por pelo menos 24h.

.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnológico (CNPq), à Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Referências

Bond RF, Johnson G 3rd. Vascular adrenergic interactions during hemorrhagic shock. Fed Proc. 1985; 44(2):281-9.
Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72:248-54; 1976.
Dewar D, Moore FA, Moore EE, Balogh Z. Postinjury multiple organ failure. Injury. 2009; 40(9):912-8.
Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. Nat Med. 2011; 17(11):1391-401.
Jacobs DS, DeMott WR, Grady HJ, Horvat RT, Huestis DW, Kasten Jr BL. Laboratory Test Handbook. 4º ed. Hudson (Cleveland), Lexi-Comp Inc, 1996.
Minei JP, Cuschieri J, Sperry J, Moore EE, West MA, Harbrecht BG, O'Keefe GE, Cohen MJ, Moldawer LL, Tompkins RG, Maier RV. The changing pattern and implications of multiple organ failure after blunt injury with hemorrhagic shock. Crit Care Med 2012; 40(4):1129-35.
Mullane KM, Kraemer R, Smith B. Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. J Pharmacol Methods. 14(3):157-67; 1985.
Nast-Kolb D, Aufmkolk M, Rucholtz S, Obertacke U, Waydhas C. Multiple organ failure still a major cause of morbidity but not mortality in blunt multiple trauma. J Trauma 2001; 51(5):835-41.
Schreiber MA. Coagulopathy in the trauma patient. Curr. Opin. Crit. Care 2005; 11:590-597.
Sordi R, Chiazza F, Patel NS, Doyle RA, Collino M, Thiemermann C. 'Preconditioning' with low dose lipopolysaccharide aggravates the organ injury / dysfunction caused by hemorrhagic shock in rats. PLoS One. 2015; 10(4):e0122096.
Sordi R, Chiazza F, Patel NSA, Brohi K, Collino M, Thiemermann C. Inhibition of IκB kinase attenuates the organ injury and dysfunction associated with haemorrhagic shock. Mol Med. 2015. In press.